

Pedro Latorre Muro

Mecanismos moleculares de regulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (pck1) y su aplicación al metabolismo lipídico en el cerdo

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

CARRODEAGUAS VILLAR, JOSÉ
ALBERTO
LOPEZ BUESA, PASCUAL

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**MECANISMOS MOLECULARES DE
REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
LA FOSFOENOLPIRUVATO
CARBOXIKINASA CITOSÓLICA (PCK1)
Y SU APLICACIÓN AL METABOLISMO**

Autor

Pedro Latorre Muro

Director/es

CARRODEAGUAS VILLAR, JOSÉ ALBERTO
LOPEZ BUESA, PASCUAL

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2018

Mecanismos moleculares de regulación de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (Pck1) y su aplicación al metabolismo lipídico en el cerdo

Autor

Pedro Latorre Muro

Directores

Dr. Pascual López Buesa

Dr. José Alberto Carrodegas Villar

Facultad de Veterinaria

Instituto de Biocomputación Física de Sistemas Complejos

Universidad de Zaragoza

Febrero de 2018

Índice

Abreviaturas	11
Nomenclatura de genes y proteínas	11
Justificación y objetivos	13
1. Introducción.....	17
1.1. Supermouse, el ratón nacido para correr.....	19
1.2. Tejidos de interés productivo en el cerdo	19
1.2.1. El tejido muscular en el cerdo	19
1.2.2. El tejido adiposo en el cerdo	21
1.2.3. Parámetros de calidad de la carne relacionados con el tipo de fibra muscular y su composición	22
1.3. Importancia económica de la cabaña porcina en España y Aragón	23
1.4. Importancia de los polimorfismos en genética porcina	23
1.5. Metabolismo energético en especies mamíferas.....	25
1.5.2. Degradación y síntesis de glucosa.....	25
1.5.3. Degradación y síntesis de ácidos grasos	27
1.6. La fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (PEPCK-C o PCK1).....	28
1.6.1. Características de la PCK1	28
1.6.2. Mecanismo de catálisis de PCK1	29
1.6.3. Papel metabólico de la PCK1: gluconeogénesis y gliceroneogénesis	33
1.6.3.1. Gluconeogénesis.....	34
1.6.3.2. Gliceroneogénesis	35
1.6.4. Mecanismos de regulación de la expresión y actividad PCK1	35
1.6.4.1. Regulación de la expresión de PCK1: el papel de PGC1 α	36

1.6.4.2. La regulación de PCK1 por acetilación.	38
1.7. El papel de PCK1 en el desarrollo de patologías.....	40
2. Material y métodos	43
2.1. Muestras animales.....	45
2.1.1. Muestras de origen porcino.....	45
2.1.2. Muestras de tejido hepático y renal de ratón	45
2.2. Análisis de los caracteres fenotípicos de muestras de origen porcino	46
2.3. Secuenciación de la región codificante del gen <i>Pck1</i> porcino	46
2.3.1. Extracción del DNA genómico a partir de muestras de tejido.....	46
2.3.2. Secuenciación de la región codificante del gen <i>Pck1</i> porcino	46
2.4. Genotipado de la población Duroc x Landrace/Large White	48
2.4.1. Genotipado del polimorfismo c.A2456C del gen <i>Pck1</i> porcino	48
2.4.2. Genotipado del polimorfismo c.T1378A del gen <i>Pgc1α</i> porcino.....	49
2.5. Análisis estadísticos para la determinación de efectos sobre el fenotipo de las sustituciones c.A2456C de <i>Pck1</i> y c.T1378A de <i>Pgc1α</i> en la población Duroc x Landrace/Large White	49
2.5.1. Estudio de asociación sobre el polimorfismo del gen <i>Pck1</i>	49
2.5.2. Estudio de epistasis sobre los polimorfismos de los genes <i>Pg1α</i> y <i>Pck1</i>	50
2.6. Clonaje de los distintos insertos en plásmidos de expresión	51
2.6.1. Obtención de los insertos a clonar.....	52
2.6.2. Plásmidos de expresión para expresar proteína en cepas de <i>E. coli</i>	52
2.6.3. Plásmidos de expresión para expresar proteína en células de mamífero....	53

2.6.4. Elaboración de las construcciones	54
2.6.4.1. Amplificación de los fragmentos por PCR	54
2.6.4.2. Digestión de los plásmidos y los insertos	56
2.6.4.3. Ligación de los insertos con su plásmido	57
2.6.4.4. Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	57
2.6.4.5. Extracción y secuenciación de las construcciones	59
2.6.4.6. Mutagénesis dirigida	59
2.6.4.7. Otras construcciones	64
2.7. Expresión y purificación de proteínas producidas en <i>E. coli</i>	65
2.7.1. Transformación y pruebas de expresión a pequeña escala	65
2.7.2. Expresión y purificación de Pck1 porcina y del híbrido Pck1 cerdo-rata	67
2.7.2.1. Crecimiento bacteriano	67
2.7.2.2. Lisis bacteriana	67
2.7.2.3. Cromatografía de afinidad	68
2.7.2.4. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel	68
2.7.3. Expresión y purificación de Pck1 de rata	69
2.7.3.1. Expresión y purificación de Pck1 y los mutantes K-Q	69
2.7.3.2. Expresión y purificación de Pck1 y las variantes K-AcK	70
2.7.4. Expresión y purificación de ULP1	70
2.7.5. Expresión y purificación de SIRT1 y SIRT2	71
2.7.6. Expresión y purificación del complejo TIP60	71
2.8. Expresión y purificación de Pck1 en células HEK293T	72
2.8.1. Cultivo y transfección	72
2.8.2. Purificación	73

2.9. Ensayos enzimáticos	74
2.9.1. Ensayos para la determinación de las propiedades cinéticas de Pck1	74
2.9.1.1. Ensayo en el sentido de OAA a PEP	75
2.9.1.2. Ensayo en el sentido de PEP a OAA	75
2.9.1.3. Determinación de la actividad piruvato kinasa (PK).	75
2.9.1.4. Determinación de la capacidad de Pck1 de retención del intermediario enolato.....	76
2.9.2. Ensayos de actividad acetil-transferasa del complejo TIP60	77
2.9.3. Ensayos de actividad deacetilasa de SIRT1 y SIRT2.....	77
2.9.3.1. Deacetilación de muestras procedentes de HEK293T y variante Pck1 p.S90E+K91AcK	77
2.9.3.2. Deacetilación de la variante Pck1 K91AcK	78
2.9.4. Ensayos de actividad GSK3 β	78
2.10. Caracterización de las propiedades biofísicas y de sensibilidad a proteasas de Pck1.....	78
2.10.1. Dicroísmo circular (DC).....	79
2.10.2. Cristalización	79
2.10.3. Determinación de la resistencia térmica	80
2.10.4. Determinación de la sensibilidad a proteasas	81
2.11. Preparación de péptidos y análisis por LC-MS/MS.....	81
2.12. Experimentos de dinámica molecular	84
2.13. Experimentos en células de mamífero	84
2.13.1. Transfección de las células.....	85

2.13.1.1. Transfección directa	85
2.13.1.2. Transfección reversa	86
2.13.2. Prueba de expresión y detección de proteínas mediante western blot.....	86
2.13.2.1. Determinación de los niveles de proteínas endógenas	88
2.13.3. Detección de los niveles de mRNA de PCK1 endógena por medio de PCR cuantitativa (qPCR).....	89
2.13.4. Inmunoprecipitación de proteínas.....	90
2.13.4.1. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 porcina en células HEK293T .	91
2.13.4.2. Análisis de PTMs en Pgc1 α y su interacción con PPAR γ	91
2.13.4.3. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 de rata sobreexpresando SIRT1	92
2.13.4.4. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 al silenciar SIRT1 o SIRT2.....	92
2.13.4.5. Análisis de los efectos del silenciamiento de GSK3 β sobre las modificaciones postraduccionales de Pck1.....	94
2.13.5. Ensayos de determinación de síntesis de metabolitos en células HEK293T	94
2.13.5.1. Ensayos de determinación de la capacidad gluconeogénica de Pck1 porcina.....	94
2.13.5.2. Ensayos de determinación de la capacidad gluconeogénica de Pgc1 α porcina.....	95
2.13.5.3. Influencia de la acetilación en la capacidad gluconeogénica de Pck1 de rata.....	95
2.13.5.4. Determinación de la capacidad de Pck1 porcina de inducir lipogénesis	95
2.13.6. Determinación de la capacidad glicolítica en células HEK293T	96

2.13.7. Determinación de la estabilidad de proteínas sobreexpresadas en células	96
2.13.7.1. Efecto de la acetilación sobre la estabilidad de Pck1	97
2.13.7.2. Estabilidad de Pgc1 α porcina en células	97
2.13.7.3. Estabilidad de Pck1 y los mutantes S90A y T92A	97
2.13.8. Localización subcelular de las isoformas de Pgc1 α	97
2.13.9. Fraccionamiento celular	98
2.13.10. Ensayos de inhibición de kinasas	98
2.14. Purificación y análisis de la actividad Pck1 a partir de muestras de tejido murino	99
2.15. Otros análisis estadísticos	100
3. Resultados	101
3.1. Efectos de la variante M139L en la Pck1 porcina sobre el contenido graso en el cerdo	103
3.1.1. Análisis de la secuencia del gen <i>Pck1</i> porcino	103
3.1.2. Estudio de asociación del polimorfismo c.A2456C con los caracteres fenotípicos del cruce Duroc x Landrace/Large White (Du X LD/LW)	105
3.1.3. Propiedades cinéticas de Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas	107
3.1.4. Caracterización biofísica de Pck1 salvaje y la variante p.M139L	108
3.1.5. Determinación de los efectos de la mutación p.M139L en Pck1 de rata y Pck1 quimera cerdo/rata (N-terminal/C-terminal)	111
3.1.6. Efectos de la sobreexpresión de Pck1 en la capacidad gluconeogénica y lipogénica de las células HEK293T	112
3.1.7. Nivel de acetilación de Pck1 y Pck1 p.M139L en células HEK293T	114
3.1.8. Estabilidad de Pck1 y Pck1 p.M139L en células HEK293T	115
3.1.9. Frecuencias alélicas de <i>Pck1</i> en distintas razas y cruces porcinos	116
3.2. Efectos de la variante porcina p.C430S de Pgc1 α sobre la actividad PCK1	119

3.2.1. Efectos de la variante p.C430S en los niveles endógenos de PCK1	119
3.2.2. Efectos de la sobreexpresión de las variantes de Pgc1 α sobre la capacidad gluconeogénica de las células HEK293T.....	121
3.2.3. Estabilidad de Pgc1 α y Pgc1 α p.C430S en células HEK293T	122
3.2.4. Localización subcelular de las variantes de Pgc1 α	122
3.2.5. Efecto de la sustitución p.C430S sobre los niveles de O-glicosilación de Pgc1 α y su interacción con PPAR γ	124
3.2.6. Efecto epistático entre los genes <i>Pgc1α</i> y <i>Pck1</i> porcinos	125
3.3. Efectos de la acetilación sobre la actividad de PCK1	129
3.3.1. Niveles de PCK1 endógena en células gluconeogénicas	129
3.3.2. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad Pck1.....	132
3.3.3. Propiedades cinéticas y dinámicas de la Pck1 acetilada.....	137
3.3.4. Deacetilación de Pck1 dependiente de SIRT1 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	151
3.3.5. Efecto de la fosforilación sobre la estabilidad de Pck1 y su interacción con la acetilación	157
3.4. Efecto de la acetilación sobre las propiedades cinéticas de las isoformas Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas.	169
4. Discusión.....	173
5. Conclusiones.....	189
Publicaciones del autor	193
Bibliografía.....	195

Abreviaturas

Aas = aminoácidos.	IPTG = Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.	PEP = Fosfoenolpiruvato.
AcK = acetil-lisina.	LDH = Lactato deshidrogenasa.	PGC1α = Coactivador del PPARγ.
ADP = Adenosina difosfato.	MDH = Malato deshidrogenasa.	PK = Piruvato kinasa.
AGC = Control automático de ganancia.	mRNA = ARNm. Ácido ribonucleico mensajero.	PMSF = Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
ATP = Adenosina trifosfato.	MS = Espectrometría de masas.	PPARγ = Receptor activado por el proliferador del peroxisoma.
BSA = Albúmina de suero bovino.	NAD ⁺ = Nicotinamina adenina dinucleótido oxidado.	PTM = Modificación post-traducciona.
cDNA = ADNc. Ácido desoxirribonucleico codificante.	NADH = Nicotinamina adenina dinucleótido reducido.	PUGNAc = 1,5-hidroximolactona.
CHX = Cicloheximida.	NAM = Nicotinamida.	qPCR = PCR cuantitativa.
DNA = ADN. Ácido desoxirribonucleico.	OAA = Ácido oxalacético.	RNasa = ARNasa. Enzima capaz de digerir el RNA.
FBS = SFB. Suero fetal bovino.	O-GlcNAc = O-N-acetil-glucosamina.	RNAi = ARN de interferencia.
GAPDH = Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.	O-GlcNAcasas = enzimas que eliminan grupos O-GlcNAc.	RPM = Revoluciones por minuto.
GDP = Guanosina difosfato.	O-GT = O-N-acetil-glucosamina transferasa.	RT-PCR = PCR en tiempo real.
GFP = Green Fluorescent Protein. Proteína verde fluorescente.	PBS = Tampón salino fosfato.	SIRT1 = Regulador de información silencioso T1.
GSK3β = Glicógeno sintasa kinasa 3β.	PC = Piruvato carboxilasa.	SIRT2 = Regulador de información silencioso T2.
GTP = Guanosina trifosfato.	Pck1/2 = Fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica/mitocondrial.	SDS = Dodecil-sulfato sódico.
HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución.	PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.	SDS-PAGE = Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.
HRP = Peroxidasa del rábano picante.	PEG = Polietilenglicol.	tRNA = ARNt. ARN de transferencia.

Nomenclatura de genes y proteínas

En el presente trabajo, los genes aparecen representados en cursiva (P. Ej.: *PCK1*), mientras que la referencia a proteínas no aparece en cursiva (P. Ej.: PCK1). Así mismo, los genes o proteínas que hacen referencia al ser humano aparecen en mayúsculas (P. Ej.: PCK1 ó *PCK1*), mientras que aquellos genes o proteínas señalados en el texto para especies no humanas aparecen con la primera letra en mayúscula y las siguientes en minúscula (P. Ej.: Pck1 ó *Pck1*).

Justificación y objetivos

La selección genética en el ganado porcino ha ido encaminada hacia la selección de canales magras por motivos de eficiencia productiva y también por la presión de los consumidores. Para ello ha usado como criterio de selección el espesor de tocino dorsal. El éxito ha sido indudable, pero ha llevado aparejada la disminución del contenido de grasa intramuscular debido a la alta correlación genética (0,7) entre ambos caracteres, lo que a su vez ha repercutido negativamente en diferentes caracteres de calidad de la carne. Sin embargo, que esta correlación no sea 1 indica que es posible seleccionar ambos caracteres de manera independiente. De hecho, se ha descrito que una mutación en IGF2 tiene un gran efecto depresor del espesor del tocino dorsal (Van Laere et al., 2003) a la vez que es capaz de aumentar hasta en un 10% el contenido de grasa intramuscular (Burgos et al., 2012). Cualquier gen que fuera capaz de inducir un fenotipo similar tendría interés para la industria del porcino. Un trabajo publicado en 2007 (Hakimi et al., 2007) mostraba efectos sorprendentes en el fenotipo de un ratón en el que se había sobreexpresado, en el tejido muscular estriado, el gen de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (*Pck1*): el ratón se convertía en un superatleta en pruebas de fondo, además de experimentar un gran aumento en su longevidad. La *PCK1* cataliza una reacción reversible en la que el oxalacetato (OAA) es transformado a fosfoenolpiruvato (PEP). Esta enzima cataliza un paso limitante de la gluconeogénesis, se encuentra en un cruce de caminos de muchas rutas metabólicas y está implicada en el metabolismo de lípidos y proteínas así como en el de glúcidos (Yang et al., 2009a). El detalle que llamó nuestra atención fue el hecho de que el contenido de grasa intramuscular aumentara en un 400% a la vez que los depósitos adiposos visceral y subcutáneo disminuían a menos de la mitad. Dado que este es el fenotipo interesante para la cría de cerdos, especialmente si se hace con vistas a la obtención de carne y productos derivados de calidad, se planteó el primer objetivo: estudiar el gen *Pck1* porcino con objeto de encontrar, y estudiar, potenciales variantes en el mismo que pudieran provocar cambios similares en la canal y en la carne de los cerdos.

Una vez que ese objetivo inicial se había conseguido, se decidió estudiar si algún otro gen podría modular los efectos de Pck1. La mayor parte de los caracteres de interés productivo son cuantitativos, es decir, son el resultado de unos pocos a cientos o miles de genes (Mackay, 2013). Este es el motivo por el que rara vez tenga sentido plantearse la selección basada en marcadores. La Pck1 está fuertemente regulada a nivel transcripcional y su promotor presenta sitios de unión para numerosos factores de transcripción. PGC1 α es un coactivador transcripcional que promueve la expresión del gen de la PCK1 (Puigserver et al., 1998; Tontonoz et al., 1995). Se ha mostrado que el polimorfismo c.T1378A en el gen del coactivador transcripcional Pgc1 α porcino (Kunej et al., 2005) está asociado a un incremento en el contenido en grasa intramuscular (Liu et al., 2011). El polimorfismo produce una sustitución Cys430Ser en la proteína Pgc1 α . Debido a la importancia del papel biológico de la Pck1 y de Pgc1 α , se planteó el segundo objetivo: determinar su posible interacción con el polimorfismo de Pck1 y estudiar los mecanismos moleculares por los que la sustitución c.T1378A de Pgc1 α porcina actúa.

Aunque Pck1 está fuertemente regulada a nivel transcripcional (Yang et al., 2009b), también presenta regulación post-traducciona. La PCK1 es acetilada en mamíferos (Zhao et al., 2010) y en *S. cerevisiae* (Lin et al., 2009) en presencia de concentraciones crecientes de glucosa. Durante el tiempo en el que se hicieron estos primeros trabajos se observó que los niveles de Pck1 en cultivos celulares no estaban regulados por los niveles de glucosa, contrariamente a lo previamente publicado (Jiang et al., 2011). No obstante, estudios realizados en ratas mostraron que los niveles y la actividad de la Pck1 se mantienen constantes durante al menos dos horas cuando son constantemente alimentadas y pese a que los niveles de mRNA de la Pck1 caen un 80% durante los primeros 30 minutos (Granner et al., 1983; Hod and Hanson, 1988; Hopgood et al., 1973; Shao et al., 2005; Tilghman et al., 1974). Además, resultados preliminares indicaban que la acetilación podría modular sus propiedades cinéticas, como se ha observado en la Pck1p de levaduras (Lin et al., 2009). Algunos autores han señalado que el papel biológico de la Pck1 va más allá de la gluconeogénesis, pudiendo estar implicada en anaplerosis (Burgess et al., 2007; She et al., 2000, 2003), pero sin evidencias sobre los

mecanismos que desencadenan dicha actividad. Con ello, se planteó el tercer objetivo: estudiar el papel de la acetilación y deacetilación de Pck1 en su actividad biológica. Para ello, se realizó una estancia en el laboratorio del Dr. John M. Denu, en la Universidad de Wisconsin-Madison, con amplia experiencia en acetilación y sirtuínas, las enzimas con actividad deacetilasa. Este trabajo se completó en la Universidad de Zaragoza.

1. Introducción

1.1. Supermouse, el ratón nacido para correr

El origen de este trabajo está inspirado en una publicación en la que se observó que la sobreexpresión de una enzima en músculo estriado de ratón aumenta el contenido de grasa intramuscular y reduce considerablemente el de grasa visceral y subcutánea (Hakimi et al., 2007), un cambio deseable en los programas de mejora porcina. En el mencionado trabajo, el incremento de la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica en músculo esquelético un 400 % tiene como resultado ratones con una gran capacidad física: mientras que los ratones no modificados son capaces de correr una distancia de 200 m, los ratones transgénicos resisten 5 Km. Además, los ratones transgénicos son más pequeños y voraces, pero sin embargo más longevos. Esto último va en contra del principio de restricción calórica que se asocia a un aumento de la esperanza de vida (Bordone and Guarente, 2005). Al igual que polimorfismos en otras especies han servido de inspiración en la investigación en genética porcina (MacLennan et al., 1990; Yeo et al., 1998), se utilizó esta misma aproximación en el presente trabajo.

1.2. Tejidos de interés productivo en el cerdo

1.2.1. El tejido muscular en el cerdo

El músculo se compone de células que se denominan miocitos o miofibrillas. Estos miocitos se agrupan en fibras musculares, las cuales se agrupan para constituir los músculos. Cada miocito se compone de unidades funcionales llamadas sarcómeros que permiten la contracción gracias a la interacción entre actina y miosina (Figura 1.1). El desarrollo de todas estas estructuras comienza ya durante la embriogénesis (Lawrie and Ledward, 2006a) y continúa tras el nacimiento.

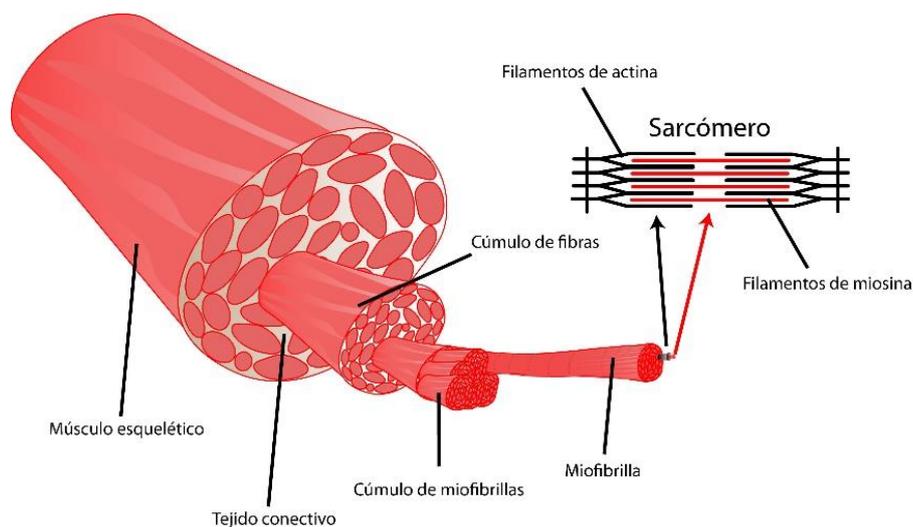


Figura 1.1. Estructura morfológica de la fibra músculo-esquelética.

El músculo se compone de dos tipos de fibras, las de tipo I y las de tipo II. La principal diferencia que radica entre ellas es la velocidad de contracción.

- Las fibras de tipo I son de contracción lenta se caracterizan por desarrollar un metabolismo de tipo oxidativo no glicolítico en el que se utilizan, entre otras moléculas, lípidos como fuente de energía (Lawrie and Ledward, 2006b). Su coloración rojiza se debe al gran acúmulo de mioglobina y tienen una gran resistencia a la fatiga (Listrat et al., 2016).
- Por otro lado, las fibras de tipo II, fibras blancas o de contracción rápida llevan a cabo un metabolismo glicolítico (Schiaffino and Reggiani, 2011), es decir obtienen energía a partir de la degradación de glucosa. Son menos resistentes a la fatiga y muestran coloración más blanca. Existen varios tipos de fibras musculares en este grupo: tipo IIA, IIB y IIX. Las fibras de tipo IIA son más resistentes a la fatiga y de contracción más lenta que las de tipo IIB y IIX. Las fibras de tipo IIB se presentan con más frecuencia en razas de cerdos magras, con poco contenido graso, y de tasa de crecimiento rápida. Por ejemplo, en el músculo *Longissimus* la composición de fibras musculares en la raza Piètrain es 10% tipo I, 10% IIA, 25% IIX y 55% IIB (Listrat et al., 2016).

Se ha observado que las fibras musculares son estructuras dinámicas que pueden cambiar de un tipo a otro de acuerdo a esta ruta: $I \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIB$ (Meunier et al., 2010). Aunque la mayor parte del tejido muscular en el cerdo se compone de fibras lentas, tipo I, rodeadas de varios anillos de fibras de tipo II (Lefaucheur and Vigneron, 1986), se ha observado que la raza influye en la composición de este tipo de fibras. Así, los animales más rústicos como las razas chinas o el cerdo Ibérico contienen una mayor representación de las fibras de tipo I mientras que en animales muy seleccionados predominan las de tipo II (Liu et al., 2015; Serra et al., 1998).

1.2.2. El tejido adiposo en el cerdo

El tejido adiposo se compone de células denominadas adipocitos. Estas células acumulan en su interior diversos tipos de ácidos grasos en función de la especie (Dodson et al., 2010). El desarrollo del tejido adiposo en el cerdo se da fundamentalmente en las últimas etapas del crecimiento (McDonald et al., 2010a), antes del sacrificio, y aunque energéticamente es muy costoso (McDonald et al., 2010b), aumenta la calidad de la carne. Este tejido adiposo puede dividirse en grasa visceral, subcutánea y grasa intramuscular.

La grasa visceral se deposita en la cavidad abdominal, no tiene apenas valor comercial. Por otro lado, el tocino dorsal es el ejemplo de grasa subcutánea y es por ello por lo que los esfuerzos de selección porcina han sido dirigidos a disminuir el contenido en grasa dorsal desde los 4 centímetros (Haring, 1961) hasta apenas unos pocos milímetros (Birchwood Genetics, 2011).

Por el otro lado, la grasa intramuscular es uno de los parámetros que definen la calidad de la carne (Cannata et al., 2009; Lawrie and Ledward, 2006c; Ventanas et al., 2007). Uno de los componentes que relaciona los tejidos muscular y adiposo es la grasa intramuscular. A diferencia de la grasa albergada en adipocitos, la grasa intramuscular presenta un contenido alto en fosfolípidos y colesterol. Principalmente, aparecen

presentes tres tipos de ácido graso, el oleico, el palmítico y el esteárico, aunque en el caso del cerdo se pueden encontrar otros tipos de ácidos grasos no saturados. Los fosfolípidos son más complejos que los triglicéridos ya que uno de los tres grupos hidroxilo del glicerol se combina, entre otros, con colina, etanolamina, serina, inositol o glucosa en lugar de con un ácido graso. La presencia de lípidos ricos en azúcares es frecuente en el tejido muscular (Lawrie and Ledward, 2006b). Generalmente, la grasa intramuscular se encuentra dentro de los miocitos almacenada en forma de pequeñas gotas de grasa colocalizadas con las mitocondrias y sirven como fuente de energía. Alrededor de las fibras musculares también hay acúmulos de adipocitos que se encargan de proporcionar lípidos a las fibras musculares. La selección ha tenido como objetivo la reducción del tocino dorsal, pero esto ha llevado también a una reducción de la grasa intramuscular debida a su gran correlación negativa (-0.7 a -0.9) (Lawrence and Fowler, 2002; Sellier, 1998). Por tanto, la búsqueda de mecanismos que incrementen esta última y reduzcan el tocino dorsal sería deseable a nivel productivo y de calidad de la carne.

1.2.3. Parámetros de calidad de la carne relacionados con el tipo de fibra muscular y su composición

Aunque los parámetros para medir la calidad de la carne son numerosos, los que más se van a tratar en este trabajo son la capacidad de retención de agua, el pH post-mortem y el contenido de grasa intramuscular. La capacidad de retención de agua, un parámetro que determina la pérdida de humedad de la carne a lo largo del tiempo, y el pH dependen, entre otros factores, del tipo de fibra predominante. Así, en músculos donde predomina el tipo de fibra muscular I, las fibras no son predominantemente glicolíticas y por tanto no se produce tanto ácido láctico ni se consume tanto ATP, que producirían un gran descenso del pH. Además, la carne presenta mayor capacidad de retención de agua y es de mayor calidad. En el lado opuesto, las carnes procedentes de músculos donde predominan las fibras glicolíticas de tipo II que presentan gran cantidad de reservas de glucógeno y sufren una gran depleción postmortem de las mismas, por lo que el pH baja y esto conduce a un aumento de la exudación (Lawrie and Ledward,

2006d). La pérdida de calidad por exudación se da en músculos con endomisio fino como *L. dorsi* (lomo) (Lawrie and Ledward, 2006c), de gran importancia económica ya que supone aproximadamente el 10 % de la masa muscular total en el cerdo (Lawrie and Ledward, 2006a).

1.3. Importancia económica de la cabaña porcina en España y Aragón

La Unión Europea es el segundo mayor productor de porcino a nivel mundial. España es el segundo país de la Unión Europea en producción porcina, detrás de Alemania. La producción porcina supone el 12 % de la producción final agraria y el 34 % de la producción final ganadera (MAPAMA, 2016a). Aragón es la segunda comunidad autónoma con mayor número de cabezas (MAPAMA, 2016b), más de 5 millones. Del consumo de carne en España, el 29 % corresponde a productos derivados del cerdo, un 10 % de los cuales incluyen productos cárnicos curados entre los que destacan el jamón y el lomo curados y cuya tendencia de consumo está en alza (MAPAMA, 2016c). En Aragón, la Denominación de Origen Jamón de Teruel (DOJT) elabora productos cárnicos de alta calidad por medio de un cruce de una línea paterna Duroc y una materna Landrace/LargeWhite cuya producción y consumo se han incrementado en los últimos años, tras la crisis (DOJT, 2016).

1.4. Importancia de los polimorfismos en genética porcina

El fenotipo es la manifestación observable de los genes que se encuentran en un ambiente determinado. Por tanto, el fenotipo es la suma del genotipo más el ambiente. Es decir, el fenotipo tiene dos componentes, el genético y el ambiental. La mayor parte de los caracteres que definen a los individuos y especialmente los importantes en producción animal son cuantitativos, esto es, el fenotipo es el resultado de la suma de los efectos de unos pocos hasta cientos o miles de genes. El efecto de cada uno de esos genes se denomina efecto aditivo. La componente genética, que define el genotipo, presenta, además de efectos aditivos, efectos de tipo dominante y epistático (Falconer and Mackay, 1996a). Para la selección genética es necesario que haya variabilidad entre

los individuos, es decir, polimorfismos en los genes de una determinada población (Falconer and Mackay, 1996b), aunque se ha visto que la mayor parte de ellos son neutros, o sea, no tienen efecto en las condiciones ambientales en las que se han observado (Falconer and Mackay, 1996c). Además de los polimorfismos, otras mutaciones, como la variación en el número de copias de un gen, tienen también interés productivo (Wang et al., 2015).

Uno de los polimorfismos más importantes en genética porcina es el c.C1378T en *RYR1*, el gen que codifica el receptor de rianodina, también conocido como el gen del halotano, que produce grandes cambios en la canal y la calidad de la carne (Fujii et al., 1991). Otros polimorfismos importantes que se han descubierto en el cerdo se encuentran en *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2) (Jeon et al., 1999; Van Laere et al., 2003; Nezer et al., 1999), que tiene efectos sobre la muscularidad, y en *MC4R* (Melanocortin 4 Receptor) (Kim et al., 2000), que está implicado en el comportamiento alimentario modificando así el contenido graso de la canal y la carne. El descubrimiento de estos polimorfismos ha permitido llevar a cabo la selección basada en marcadores (Hayes and Goddard, 2003). El trabajo en genes porcinos como *RYR1* (MacLennan et al., 1990) y *MC4R* (Wang et al., 2013; Yeo et al., 1998) ha tenido su origen en la observación de los efectos de algunos polimorfismos en el fenotipo de otras especies como la humana. Sin embargo, estos polimorfismos son ejemplos de genes mayores, es decir, sus efectos son cuantitativamente relevantes y explican un porcentaje bastante elevado de la variación observada entre individuos. Además del efecto aditivo, los efectos epistáticos o la interacción entre dos genes también contribuyen a definir el fenotipo por medio de distintos mecanismos: el contacto directo entre genes (Smemo et al., 2014), modificando la expresión de otros genes (Tsubota et al., 2007) o a nivel metabólico (Modjtahedi et al., 2015), entre otros.

El estudio del genoma porcino ha conseguido identificar genes implicados en definir la raza, la olfacción o la sensibilidad a patógenos (Groenen et al., 2012) y ha llevado al desarrollo de herramientas para la selección genómica (Badke et al., 2014; Hidalgo et

al., 2015). Sin embargo, estos estudios no han profundizado los mecanismos por los que los polimorfismos actúan. Es por ello, por lo que esta información resulta de especial interés cuando los efectos de un único gen explican menos del 1% de la variación encontrada, pero que contribuiría a los programas de mejora.

1.5. Metabolismo energético en especies mamíferas

El metabolismo es todo aquel conjunto de reacciones químicas, catalizadas principalmente por enzimas, que permite la obtención de energía a partir de fuentes externas al organismo, convertir los nutrientes en moléculas útiles para la célula, sintetizar macromoléculas a partir de precursores y degradar moléculas para garantizar el correcto funcionamiento de la célula (Nelson and Cox, 2005a). El metabolismo incluye la síntesis y degradación de cuatro grandes grupos de moléculas: ácidos nucleicos, glúcidos, lípidos y proteínas. En este trabajo sólo se considerarán los aspectos más importantes del metabolismo de glúcidos y lípidos.

1.5.2. Degradación y síntesis de glucosa

Los glúcidos son las moléculas más abundantes en la naturaleza. Estas moléculas pueden ser unidades sencillas llamadas monosacáridos o agruparse en oligosacáridos (2 a 19 monosacáridos) o polisacáridos (20 o más monosacáridos) (Nelson and Cox, 2005b). Otros autores consideran oligosacáridos a los de 2 a 10 unidades y polisacáridos a los de más de 10 unidades (Murray et al., 2003). El monosacárido más abundante es la glucosa. El proceso de degradación de glucosa se denomina glicólisis mientras que el proceso de síntesis de la misma a partir de precursores se denomina gluconeogénesis.

La glicólisis es el conjunto de reacciones enzimáticas que dan lugar a dos moléculas de piruvato a partir de una de glucosa. La glicólisis tiene dos fases, una primera preparatoria en la que la molécula de glucosa es transformada en gliceraldehído-3-fosfato y, una segunda fase en la que se producen reacciones de oxidación que dan lugar a la obtención de energía y las mencionadas moléculas de piruvato. Se ha observado que tanto durante

la glicólisis como durante la gluconeogénesis, es necesario mantener un reservorio de fosfoenolpiruvato (PEP), un intermediario de la glicólisis y gluconeogénesis, en el citosol que permita llevar las reacciones en uno u otro sentido (Stark et al., 2009, 2014). En condiciones de aerobiosis, el piruvato obtenido entra en el ciclo de Krebs para completar la oxidación de la glucosa y obtener gran cantidad de energía (Nelson and Cox, 2005c). El piruvato es transformado por la piruvato deshidrogenasa generando acetil-CoA que se incorpora al oxalacetato formando citrato. Además, el piruvato también puede transformarse en ácido oxalacético (también oxalacetato, OAA) y acetil-CoA por parte de la piruvato carboxilasa (PC), lo que proporciona los sustratos para comenzar el ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico o de los ácidos tricarboxílicos tiene lugar en las mitocondrias, es un proceso catabólico y contribuye a la respiración celular o fosforilación oxidativa y permite la obtención de energía principalmente en forma de ATP. (Nelson and Cox, 2005d) (Figura 1.2A). En mamíferos, en condiciones de anaerobiosis el piruvato se fermenta a lactato. El rendimiento energético de este proceso es muy pobre con respecto a la respiración aerobia, casi 10 veces inferior. La glicólisis es muy frecuente en células tumorales que para mantener su crecimiento requieren de una gran cantidad de energía, pero que además no tienen acceso al oxígeno que necesitan para oxidar completamente la glucosa. Este cambio de metabolismo oxidativo a glicolítico es el conocido efecto Warburg (Vander Heiden et al., 2009; Warburg et al., 1924).

La gluconeogénesis consiste en la síntesis de glucosa a partir de moléculas precursoras. La síntesis de glucosa tiene un coste energético ya que consume, entre otras moléculas, ATP (Nelson and Cox, 2005c). La presencia de PEP en el citosol en este caso es fundamental para formar nueva glucosa. Sin embargo, la piruvato kinasa no es capaz de catalizar la conversión de piruvato a PEP. Por ello, la presencia de PEP a partir de metabolitos procedentes de la mitocondria se da a partir de dos rutas principalmente; bien a partir de OAA que es transformado en PEP por la fosfoenolpiruvato carboxikinasa mitocondrial (PCK2) y por medio de un transportador es exportado de la mitocondria al citosol (Stark et al., 2014), o bien el OAA es transformado en malato por la malato

deshidrogenasa mitocondrial (MDH2), el malato es exportado a través de la lanzadera de malato al citosol, transformado en OAA de nuevo por la isoforma citosólica de esa misma enzima, MDH1, y finalmente el OAA es transformado en PEP por parte de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (PCK1) (Nelson and Cox, 2005c; Yang et al., 2009a) (Figura 1.2B).

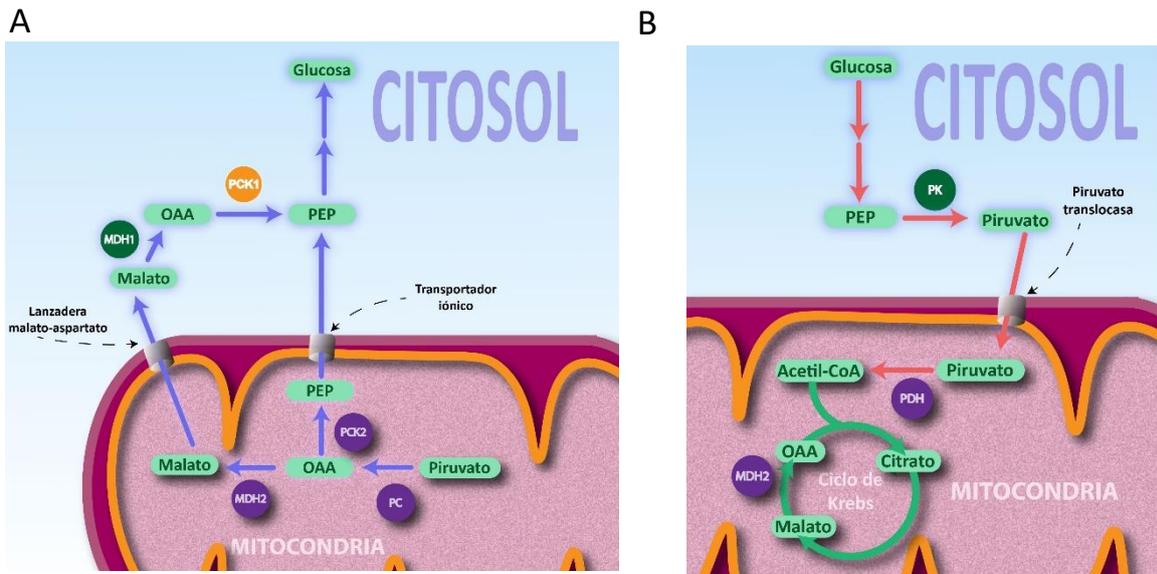


Figura 1.2. Representación esquemática de los procesos de (A) gluconeogénesis y (B) glicólisis dentro de una célula. En las cajas redondeadas verdes se representan distintos metabolitos. PEP = fosfoenolpiruvato y OAA = oxalacetato. Los círculos representan las enzimas que catalizan la reacción señalada por cada flecha. PCK1/2 = fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica/mitocondrial. MDH1/2 = malato deshidrogenasa citosólica/mitocondrial. PK = Piruvato kinasa. PC = Piruvato carboxilasa.

1.5.3. Degradación y síntesis de ácidos grasos

La oxidación o degradación de ácidos grasos proporciona gran parte de la energía a los tejidos. Por medio de un proceso denominado β -oxidación se obtienen moléculas de acetil-CoA que son utilizadas en el ciclo de Krebs para obtener energía. Generalmente, el tejido adiposo almacena los ácidos grasos en forma de triglicéridos, que son tres moléculas de ácidos grasos esterificadas a una de glicerol. En el tejido adiposo, los triglicéridos son movilizados al citosol en respuesta a estímulos hormonales y ahí son individualizados en ácidos grasos que viajan acompañados de lipoproteínas a través del torrente sanguíneo a órganos como el hígado, el corazón o el músculo. Una vez en las

células diana, los ácidos grasos son oxidados en el citosol a moléculas de acetil-CoA que entran en la mitocondria y son oxidadas en el ciclo de Krebs para la obtención de energía. Este proceso requiere de la presencia de un gran número de mitocondrias para satisfacer los requerimientos energéticos de la célula (Nelson and Cox, 2005e).

La síntesis de ácidos grasos es un proceso repetitivo que se lleva a cabo en el citosol gracias a la ácido graso sintasa que utiliza acetil-CoA y malonil-CoA como sustratos. En el tejido adiposo, los ácidos grasos se esterifican con glicerol-3-fosfato formando triglicéridos. El proceso de formación de glicerol-3-fosfato recibe el nombre de gliceroneogénesis. Se ha observado que la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo es muy baja (Patel et al., 1975) y que se sintetizan principalmente en el hígado. Los ácidos grasos sintetizados en el hígado pueden ir a órganos como el músculo para proporcionar energía y otros se unen al glicerol-3-fosfato y forman triglicéridos. Estos triglicéridos viajan por el torrente circulatorio acompañados de lipoproteínas de baja densidad y son escindidos en ácidos grasos simples por la lipoproteína lipasa. Una vez en el adipocito, se re-esterifican de nuevo en forma de triglicéridos (Nelson and Cox, 2005f). Aunque tradicionalmente se consideraba que el glicerol-3-fosfato formado en el hígado provenía de la glicólisis, ofreciendo una clara relación entre el metabolismo de glúcidos y lípidos, los estudios más recientes permiten confirmar que esta proporción es muy baja y que la mayor parte del glicerol-3 fosfato generado en el hígado proviene de la gliceroneogénesis (Kalhan et al., 2001, 2008; Nye et al., 2008).

1.6. La fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (PEPCK-C o PCK1)

1.6.1. Características de la PCK1

La fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica, PCK1 o PEPCK-C es una enzima que cataliza la reacción reversible que transforma oxalacetato (OAA) en fosfoenolpiruvato (PEP) (Reacción 1.1):



Reacción 1.1. Reacción reversible catalizada por la PCK1.

Existen dos isoformas de la enzima, una localizada en la mitocondria (PCK2) y otra en el citosol (PCK1) que están codificadas por dos genes nucleares. Inicialmente la enzima se purificó y descubrió a partir de hígado de pollo (Utter and Kurahashi, 1954). La presencia de las distintas isoformas en tejidos gluconeogénicos como el hígado depende de la especie (Hanson and Patel, 1994). Así, en aves la isoforma mayoritaria presente es la mitocondrial mientras que, en el extremo opuesto, en roedores el 95% de toda la actividad PCK corresponde a la isoforma citosólica. En especies como el humano o el cerdo la presencia de ambas isoformas se da al 50%. La vida media de la PCK1 en tejidos es de unas 20 horas (Hopgood et al., 1973), siendo de 6 a 8 horas tras la ingesta de alimento, y mucho mayor en animales recién nacidos (Philippidis et al., 1972).

En mamíferos, la PCK1 es un monómero que contiene 622 aminoácidos y es una enzima GDP/GTP dependiente (en bacterias y levaduras depende de ADP/ATP) (Carlson and Holyoak, 2009). La PCK1 está muy conservada entre las distintas especies (Chakravarty et al., 2005; Hanson and Reshef, 1997) y en mamíferos el porcentaje de identidad es del 80-90%. Además, cabe destacar que la PCK1 presenta un total de 13 cisteínas expuestas que son susceptibles de oxidarse (Hebda and Nowak, 1982; Lewis et al., 1989), es decir, podrían formar puentes disulfuro.

1.6.2. Mecanismo de catálisis de PCK1

La PCK1 no presenta dominios bien definidos (Figura 1.3A). Estructuralmente, se habla de lóbulos (Johnson and Holyoak, 2012), uno en el extremo N-terminal (residuos 1-259) y otro en el C-terminal (260-622). A su vez, el extremo C-terminal presenta un dominio de unión a nucleótidos (residuos 260-325 y 426-622) y un dominio PCK (326-425). El dominio PCK recibe su nombre ya que es característico de la familia de proteínas PCK. Además, la PCK1 presenta tres “loops” o bucles esenciales para la catálisis (Figura 1.3B). El R (residuos 85-92) el P (residuos 284-292) y el Ω (residuos 464-474) (Carlson and Holyoak, 2009). Los datos cinéticos y estructurales indican que estos tres “loops” son

esenciales durante la catálisis, donde se coordinan de manera precisa (Johnson and Holyoak, 2010, 2012; Johnson et al., 2016).

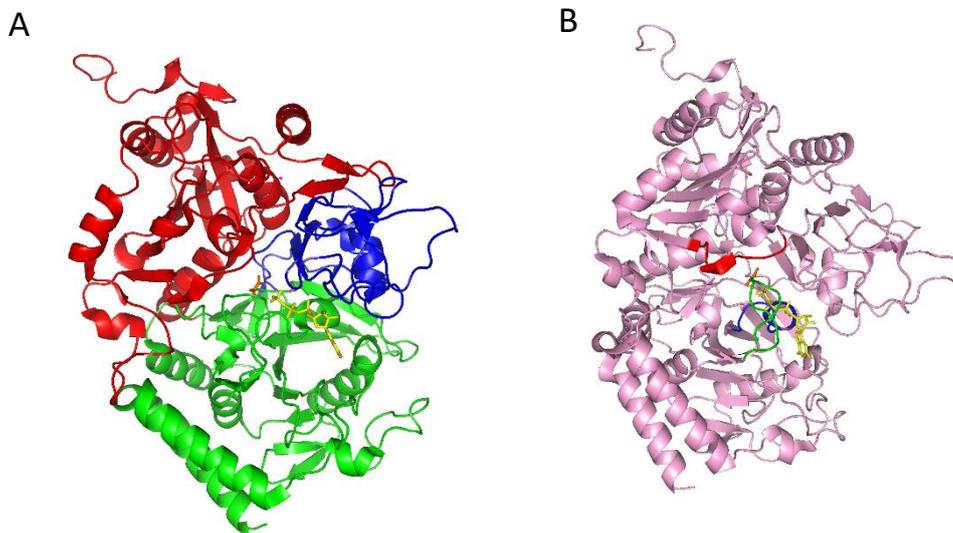


Figura 1.3. Estructura de PCK1. (A) Se representan el lóbulo N-terminal (rojo, residuos 1-259), el sitio de unión a nucleótidos (verde, residuos 260-325 y 426-622), y el dominio específico de PCK (azul, residuos 326-425) de PCK1. (B) Representación de los “loops” R (rojo, residuos 85 a 92), P (azul, residuos 284 a 292) y Ω (verde, residuos 464 a 474) Se muestran además los ligandos oxalato (naranja) y GTP (amarillo). Imágenes generadas a partir de la estructura de Pck1 de rata, PDB: 3DT2.

La PCK1 sigue un mecanismo de catálisis ordenado (Carlson and Holyoak, 2009; Holyoak et al., 2006). En primer lugar, el oxalacetato (OAA) se coordina con un átomo de manganeso. Una vez en el sitio activo, el OAA-Mn²⁺ se coordina con R87 y S286 (Figura 1.4A). K244, H261 y N311 coordinan el metal y contribuyen a fijar el OAA. El GTP se coordina con un átomo de magnesio y queda anclado al sitio activo por medio de N403, R405, K290 y R436 (Figura 1.4B). La coordinación de ambos metales es necesaria para la correcta orientación del OAA y del GTP, aunque la distancia entre ambos sustratos aún es grande. Es entonces, cuando K290 del loop-P, tiende un puente con los fosfatos β y γ del GTP acercando éste último hacia el OAA, facilitando su liberación. En este proceso, N403 y R405 también juegan un papel clave para estabilizar el grupo fosfato que se transfiere. El resultado final es fosfoenolpiruvato (PEP). En este proceso y justo antes de la formación del PEP, se genera una molécula de CO₂, proveniente de la descarboxilación del OAA, que queda coordinada con F333 y Y235 (Figura 1.4C). Esta descarboxilación del

OAA da lugar a un intermediario de la reacción, el enolato. Finalmente, el PEP queda unido a R87, S286, K290, N403 y R405 y el GDP a R436 y K290 (Figura 1.4D). Completada la catálisis, los productos se liberan. Se ha visto que los residuos W516, F527, F525, W527, F530 y N533 también contribuyen a la catálisis reconociendo y uniéndose específicamente a GTP/GDP (aunque también a IDP/ITP). La diferencia con moléculas como ATP o ADP parece radicar en el grupo carbonilo presente en el carbono 6 del anillo de purina de los nucleótidos derivados de inosina (ITP/IDP) o guanosina (GTP/GDP), que no está en los derivados de adenosina.

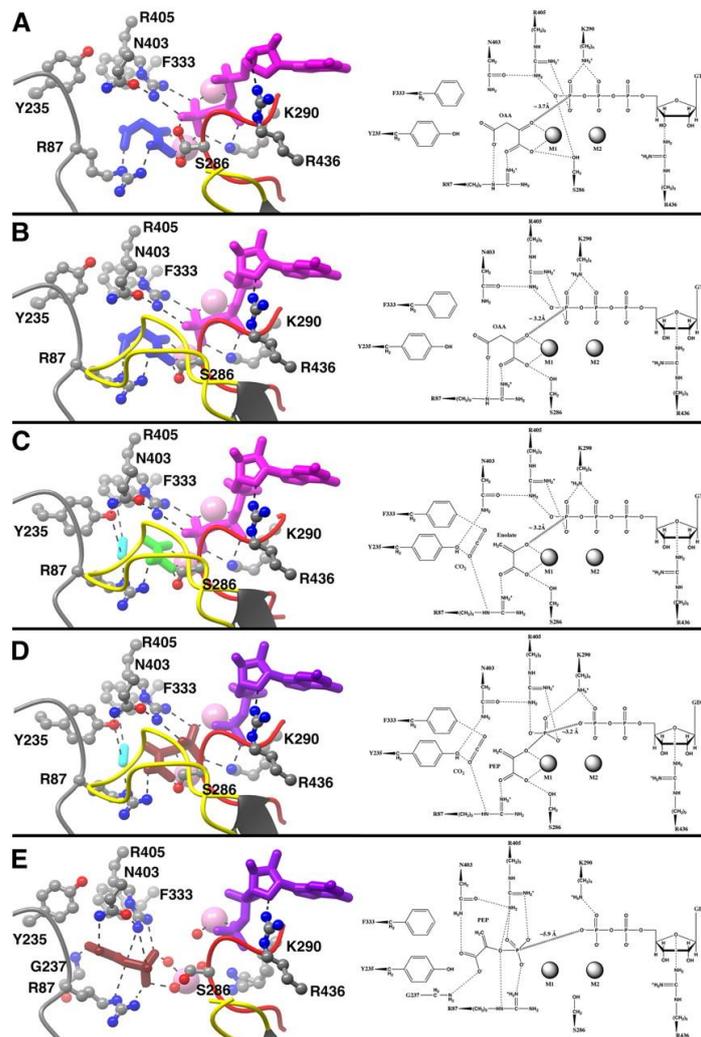


Figura 1.4. Detalle estructural y esquemático del mecanismo de catálisis de la PCK1. (A-E) La descripción de los distintos pasos aparece detallada en el texto principal. Imagen tomada de: Carlson, G.M., and Holyoak, T. (2009). Structural insights into the mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. *J. Biol. Chem.* 284, 27037–27041.

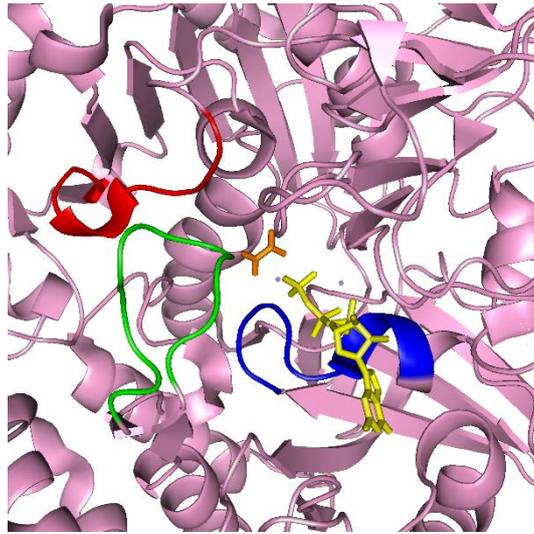


Figura 1.5. Detalle del sitio catalítico de PCK1. Representación de los “loops” R (rojo, residuos 85 a 92), P (azul, residuos 284 a 292) y Ω (verde, residuos 464 a 474). Se muestran además los ligandos oxalato (naranja) y GTP (amarillo). Los puntos al lado del GTP son átomos de manganeso. Imágenes generadas a partir de la estructura de Pck1 de rata, PDB: 3DT2. Obsérvese en este caso que el loop- Ω cierra el sitio activo.

La formación y estabilización del enolato es el punto crítico de la reacción ya que la protonación espontánea del mismo, que es lo que sucede si no está protegido por una determinada conformación de la enzima lo que conllevaría la formación de piruvato en lugar de PEP. Es por ello por lo que el sitio activo debe cerrarse y excluir el agua y por lo que el mecanismo de catálisis de PCK1 requiere de un sistema de apertura y cierre. Uno de los aspectos más importantes para la actividad de Pck1 es la movilidad de los “loops” durante la catálisis. Así, como se ha mencionado más arriba, el loop-P permite la aproximación del enolato al fosfato y del GTP. Sin embargo se ha visto que el loop- Ω es crítico a la hora de proteger el enolato (Johnson and Holyoak, 2010, 2012) (Figura 1.5). Aunque ningún residuo de este “loop” está en contacto directo con los sustratos o los intermediarios, su movimiento protege al intermediario de la reacción, asegura el correcto posicionamiento de los sustratos y el cierre del sitio activo durante la catálisis. En el caso del loop-R, la arginina 87 se coordina tanto con OAA como con PEP durante la catálisis. Además, en esta región móvil se encuentra el glutamato 89 que es un elemento clave durante la catálisis gracias a sus interacciones con la histidina 470 (loop- Ω). Ambos residuos forman un puente que garantiza el movimiento coordinado de los

loops-R y Ω (Johnson et al., 2016). También se ha visto que el correcto cierre del loop- Ω requiere de la estabilización del extremo N-terminal de la proteína gracias a la interacción de los residuos R461 y E588 y de la estabilización del extremo C-terminal por las interacciones entre H477 y E591 (Cui et al., 2017).

En conclusión, el mecanismo de catálisis de PCK1 requiere de la coordinación de determinados elementos móviles para garantizar la protección del enolato, pero esta movilidad se da a través de la interacción entre residuos que no están directamente implicados en la catálisis.

1.6.3. Papel metabólico de la PCK1: gluconeogénesis y gliceroneogénesis

Como se ha mencionado anteriormente, la PCK1 es capaz de realizar una reacción reversible. Sin embargo, los estudios realizados hasta ahora permiten concluir que principalmente sintetiza PEP a partir de OAA (Yang et al., 2009a). No se conoce bajo qué circunstancias la PCK1 lleva a cabo la reacción que sintetiza OAA a partir de PEP.

La PCK1 es una enzima cataplerótica, esto es, elimina metabolitos del ciclo de Krebs y descarboxila el OAA generando PEP, que es necesario para la gluconeogénesis, la gliceroneogénesis o la síntesis de aminoácidos. Se le atribuye un papel en el desarrollo de tejidos (Semakova et al., 2017), o en el suministro de metabolitos al ciclo de Krebs formando PEP a partir de restos de aminoácidos para integrarlos de nuevo en forma de piruvato (Yang et al., 2009a). Varios trabajos han indicado que también tendría un papel en la anaplerosis (Burgess et al., 2007; Hakimi et al., 2007; She et al., 2000, 2003), pero no se conoce claramente su papel real en esta función ni tampoco se conocen los mecanismos por los que esta actividad se llevaría a cabo.

1.6.3.1. Gluconeogénesis

La gluconeogénesis es una de las principales funciones asociadas a la PCK1 (Hanson and Patel, 1994). La formación de PEP a partir de OAA mantiene un reservorio de PEP que permite a la célula la síntesis de glucosa. Se ha visto que la abolición de la expresión de PCK1 conlleva la muerte en cuestión de días tras el nacimiento (She et al., 2000) mientras que la abolición hepática sólo disminuye entre un 30 y un 40% la síntesis de glucosa, pero sin embargo produce grandes cambios en los niveles de triglicéridos en sangre además de producir hígado graso (Burgess et al., 2007; She et al., 2000, 2003).

Se ha visto que la PCK2, la isoforma mitocondrial, tiene un papel importante durante la gluconeogénesis (Méndez-Lucas et al., 2013; Stark et al., 2009). Tradicionalmente, la PCK2 se ha considerado una enzima capaz de llevar a cabo la gluconeogénesis a partir de lactato (Watford et al., 1981). La sobreexpresión de PCK2 en animales deficientes en PCK1 hepática incrementa considerablemente la capacidad gluconeogénica de los mismos, y aunque no consigue restaurar el fenotipo, sí consigue disminuir los niveles de triglicéridos que se presentan alterados en los animales deficientes en PCK1 (Méndez-Lucas et al., 2013). Otros autores han señalado la capacidad de PCK2 de formar PEP a partir de OAA que pasa al citosol a través de un transportador y mantiene el reservorio de PEP (Stark et al., 2009, 2014). Es más, la deficiencia de PCK2 en hígado tiene fuertes consecuencias sobre la capacidad gluconeogénica en animales, alterando el equilibrio del ciclo de Krebs (Stark et al., 2014).

En conclusión, la existencia de ambas isoformas y la capacidad de que una de ellas pueda compensar parcialmente el papel de la otra lleva a pensar que ambas son necesarias en tejidos gluconeogénicos y su papel aún está por ser explorado. Además, las observaciones en otros trabajos previos (Burgess et al., 2007; Méndez-Lucas et al., 2013; She et al., 2000) sugieren un papel biológico de la PCK1 en la regulación del tráfico de metabolitos en el ciclo de Krebs.

1.6.3.2. Gliceroneogénesis

Aunque el tejido adiposo es capaz de acumular grasas, en realidad es el hígado el que lleva a cabo la síntesis de triglicéridos que viajan en forma de lipoproteínas al tejido adiposo para almacenarse (Nye et al., 2008; Patel et al., 1975). Durante la gliceroneogénesis se forma glicerol-3-fosfato que es necesario para la esterificación de ácidos grasos y la síntesis de triglicéridos. Aunque este glicerol-3-fosfato se puede recuperar de nuevo en situaciones de ayuno y es una fuente de carbono fundamental para la síntesis de glucosa, en humanos los niveles en sangre no superan 0.25 mM (Stinshoff et al., 1977). Sin embargo, los niveles de glicerol en sangre en el eperlano (*Osmerus mordax*), un pez pariente del salmón, son de 400 mM (Driedzic et al., 2006; Kidder et al., 2006; Treberg et al., 2002). Esta especie de pez, habita en el Atlántico norte donde las temperaturas son bajas de manera constante y donde el glicerol actuaría como un anticongelante. Además, se ha observado que los niveles de mRNA de PCK1 en *O. mordax* están aumentados cuando se producen los picos de síntesis de glicerol. Este glicerol no proviene de la lipólisis sino de la degradación de aminoácidos, algo semejante a lo que sucede con el 15-20% del glicerol total en humanos durante el ayuno (Jensen et al., 2001). En relación con la síntesis de glicerol, se ha visto que *C. elegans* presenta una gran resistencia al choque osmótico en medio suplementado con 0.3 M NaCl (Frazier and Roth, 2009). Además, las larvas cuyas madres fueron expuestas a este choque osmótico eran resistentes también a niveles 10 veces mayores de glicerol que las larvas control. La supresión del gen *Pck1*, neutralizó este efecto. Otro ejemplo del papel de *Pck1* en gliceroneogénesis es el ratón transgénico que expresa en músculo esquelético la *Pck1* e incrementa el nivel de grasa intramuscular (Hakimi et al., 2007). Todas estas observaciones permiten concluir que la PCK1 puede tener un papel significativo en la síntesis de triglicéridos y que esta síntesis no proviene necesariamente de la glucosa.

1.6.4. Mecanismos de regulación de la expresión y actividad PCK1

La PCK1 se expresa en tejidos puramente gluconeogénicos como el hígado o el riñón (Burgess et al., 2007; Owen et al., 2002; She et al., 2000), pero también se ha visto su

presencia en el intestino (Owen et al., 2002), músculo, corazón (Hakimi et al., 2007) y tejido adiposo (Franckhauser et al., 2002). Tradicionalmente, se ha considerado que la PCK1 estaba regulada a nivel transcripcional (Hanson and Reshef, 1997; Yang et al., 2009b) y ha sido un modelo de estudio de la regulación a este nivel. Sin embargo, recientemente se ha visto que también es regulada por acetilación (Lin et al., 2009; Zhao et al., 2010).

1.6.4.1. Regulación de la expresión de PCK1: el papel de PGC1 α

La PCK1 es un ejemplo de enzima fuertemente regulada a nivel transcripcional (Hanson and Reshef, 1997; Yang et al., 2009b). Su región promotora contiene numerosos sitios de unión para un gran número de factores de transcripción (Figura 1.6). Por ello, PCK1 es un modelo de regulación de la expresión desde el punto de vista nutricional que ha sido ampliamente estudiado y revisado (Chakravarty et al., 2005; Hanson and Patel, 1994; Hanson and Reshef, 1997; Yang et al., 2009b).

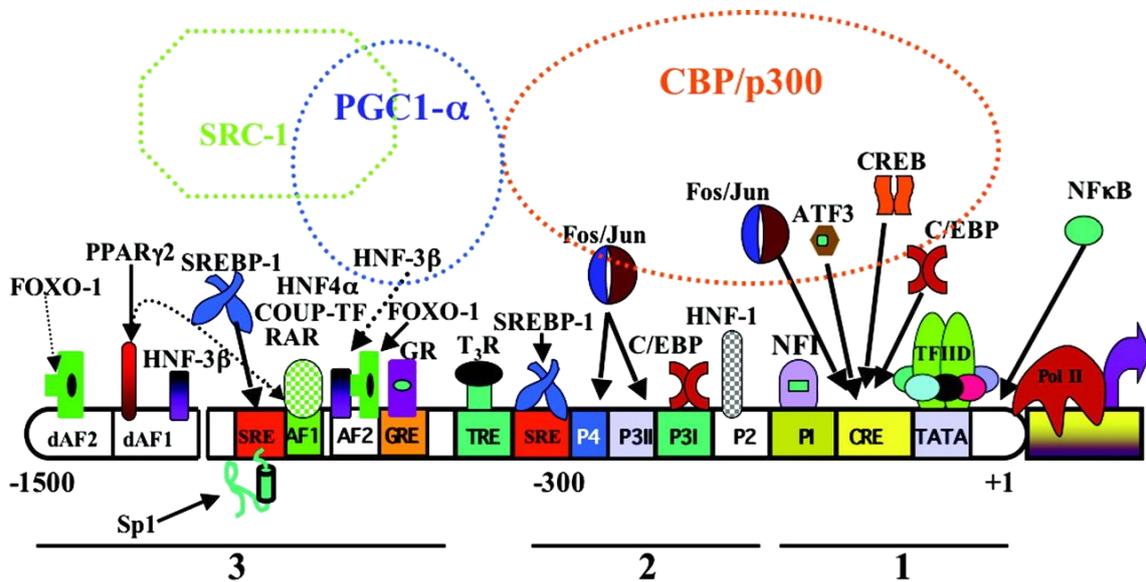


Figura 1.6. Representación de la región promotora del gen de la PCK1. Una gran cantidad de sitios de unión son controlados por un gran número de factores de transcripción. Imagen tomada de: Hanson, (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 1705-15.

Además, estos elementos de la región promotora dependen del tejido (Chakravarty et al., 2005), así en cada tejido la expresión de PCK1 responde a distintos estímulos. En general, la expresión de PCK1 responde a glucocorticoides e insulina. Los glucocorticoides incrementan la expresión de PCK1 en tejidos gluconeogénicos (Cassuto et al., 2005) mientras que en tejido adiposo la reprimen (Olswang et al., 2003). Además, la insulina es un represor de la expresión de PCK1 (Duong et al., 2002).

El mRNA de PCK1 tiene una vida media bastante corta, de unos 30 minutos (Granner et al., 1983; Hod and Hanson, 1988; Tilghman et al., 1974), en tejidos vivos que contrasta con la larga vida media de la proteína (Hopgood et al., 1973). Se ha visto que hay numerosos elementos en la región 3' que condicionan esa inestabilidad (Hajarnis et al., 2005). Aunque la expresión de PCK1 aparece controlada por numerosos factores de transcripción a continuación se hace referencia al estudiado en este trabajo, PGC1 α .

PGC1 α es uno de los reguladores transcripcionales más importantes a nivel metabólico. Inicialmente se descubrió como un activador de PPAR γ (Puigserver et al., 1998), que a su vez es un regulador de la expresión de PCK1 (Tontonoz et al., 1995). PGC1 α no sólo regula rutas metabólicas sino que, además, contribuye a la biogénesis mitocondrial (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011), interacciona con proteínas con actividad acetiltransferasa (Finck and Kelly, 2006) o determina el tamaño de fibra muscular (Lin et al., 2002). El control de la expresión de PCK1 y de otros muchos genes por parte de PGC1 α regula la gluconeogénesis (Yoon et al., 2001) y también juega un papel en enfermedades como la diabetes o el cáncer (Sharabi et al., 2017). Distintos tipos de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (Li et al., 2007), la acetilación (Takikita et al., 2010) o la O-glicosilación (Housley et al., 2009) modifican la actividad o la estabilidad de PGC1 α . En humanos, la sustitución Gly482Ser modifica el metabolismo lipídico en hepatocitos debido a un cambio en la capacidad de inducir la expresión de PCK1 (Chen et al., 2013b). En el cerdo también se ha observado que la sustitución Cys430Ser (Kunej et al., 2005) está asociada a cambios en contenido graso (Liu et al., 2011) o a los valores

de pH (Gandolfi et al., 2011) aunque no en todas las poblaciones estudiadas (Erkens et al., 2009, 2010).

1.6.4.2. La regulación de PCK1 por acetilación.

Las modificaciones post-traduccionales son cambios químicos que suceden en determinados residuos de las proteínas y que generalmente afectan a su actividad o a su estabilidad. La fosforilación fue la primera modificación que se descubrió, gracias al descubrimiento de fosfatasas y kinasas que actuaban sobre la glucógeno fosforilasa y al efecto de sus efectos sobre este enzima (Fischer and Krebs, 1955a, 1955b). Ha sido la modificación más estudiada y a la que se le atribuyen funciones muy diversas (Humphrey et al., 2015; Hunter, 2007; Lin et al., 1996). El desarrollo de las técnicas de espectrometría de masas ha permitido ampliar el estudio de otras modificaciones como la acetilación de lisinas (Guarente, 2011) o la O-glicosilación (Slawson et al., 2010), entre otras muchas modificaciones, cuyo papel en el metabolismo y el desarrollo de enfermedades aún está por conocer en muchos casos. De hecho, la acetilación de lisinas ha demostrado ser uno de los mecanismos de regulación metabólica en diversos organismos (Wang et al., 2010; Zhao et al., 2010). Entre otras funciones, la acetilación de lisinas es capaz de modificar la actividad de enzimas como la malato deshidrogenasa citosólica, MDH1, (Kim et al., 2012; Zhao et al., 2010) y la mitocondrial, MDH2, (Yang et al., 2015) o su estabilidad, como sucede con la piruvato kinasa M2, PKM2, (Lv et al., 2011). Se ha descrito también la acetilación de PCK1 en distintos organismos y en diferentes lisinas (Lin et al., 2009; Lundby et al., 2012; Shen et al., 2016; Weinert et al., 2013; Zhao et al., 2010). La acetilación la llevan a cabo acetil-transferasas. Se ha señalado que tanto TIP60 (Lin et al., 2009) como p300 (Jiang et al., 2011) pueden ser acetil-transferasas de PCK1. A su vez, p300 es un importante factor de transcripción, y en el caso de PCK1, el complejo CBP (CREB binding protein)/p300 actúa sobre el promotor de PCK1 reprimiendo su expresión por distintos mecanismos (Leahy et al., 1999; Wondisford et al., 2014).

Por otro lado, las sirtuínas son proteínas que eliminan los grupos acetilo de otras proteínas, es decir, son deacetilasas. Estas proteínas son sensores energéticos para la célula (Chang and Guarente, 2014) detectando los niveles de NAD^+/NADH y deacetilando acetil-lisinas de las proteínas, en muchos casos histonas, para controlar la expresión de genes. Inicialmente las sirtuínas se descubrieron como deacetilasas dependientes de NAD^+ relacionadas con la longevidad (Kaeberlein et al., 1999). En mamíferos, hay un total de 7 sirtuínas (SIRT1-7) que están localizadas en diversos compartimentos celulares: núcleo, citosol y mitocondria (Hall et al., 2013). En algunos casos (SIRT4 y SIRT5) su papel biológico es desconocido (Hall et al., 2013). SIRT1 se encuentra en el núcleo y en el citosol (Hall et al., 2013) y gracias a su actividad deacetilasa regula numerosos procesos metabólicos en la célula ya que actúan sobre factores de transcripción como p53 (Vaziri et al., 2001), FoxO (Brunet et al., 2004) o NF- κ B (Yeung et al., 2004). Con su actividad deacetilasa SIRT1 controla procesos como la gluconeogénesis (Rodgers et al., 2005) o la gliceroneogénesis (Picard et al., 2004), procesos donde PCK1 está claramente implicada (Yang et al., 2009a). Además, se ha descrito que SIRT1 puede reprimir la expresión de PCK1 al deacetilar HNF4 α (Yang et al., 2009c) y que la deacetilación de PGC1 α por parte de SIRT1 estimula la expresión de PCK1 (Rodgers et al., 2005), indicando en ambos casos una relación entre SIRT1 y PCK1. En levaduras, se ha observado que la acetilación incrementa en 8 veces la actividad de Pck1p en, al menos, el sentido reverso de la reacción y disminuye a la mitad el valor de K_m para el sustrato ADP (Lin et al., 2009). En ese mismo estudio, Sir2p, el homólogo de SIRT1 en mamíferos, es capaz de deacetilarla (Lin et al., 2009). En otro estudio, se ha observado que la acetilación de PCK1 favorece su degradación y que la deacetilación por parte de SIRT2 evita dicho fenómeno (Jiang et al., 2011). Sin embargo, se desconoce el papel de la gran cantidad de lisinas acetiladas que han sido detectadas en PCK1 (Lin et al., 2009; Lundby et al., 2012; Shen et al., 2016; Weinert et al., 2013; Zhao et al., 2010) así como las posibles consecuencias sobre su actividad o sobre el metabolismo celular.

Otras modificaciones, como la fosforilación de PCK1, ha sido descrita en diversas especies (Bian et al., 2014; Demirkan et al., 2011; Grimsrud et al., 2012; Lundby et al.,

2012; Parker et al., 2015; Robles et al., 2017; Wilson-Grady et al., 2013), pero su papel biológico no ha sido estudiado.

1.7. El papel de PCK1 en el desarrollo de patologías

El papel metabólico central de PCK1 es crítico y cualquier modificación de su actividad o expresión puede resultar letal. Así, la ausencia de PCK1 o de su actividad tras el nacimiento produce la muerte de los individuos (She et al., 2000). Por ejemplo, la sustitución Ile45Thr, junto con otras sustituciones en otras proteínas, es capaz de producir alteraciones cognitivas y obesidad (Adams et al., 2014).

PCK1 y *PCK2* se han postulado como genes candidatos involucrados tanto en la obesidad como en la diabetes tipo II (Beale et al., 2007). Mientras que en la diabetes tipo I se produce una destrucción de los islotes pancreáticos, en la diabetes tipo II, los tejidos se vuelven resistentes a la acción de la insulina y esta deja de ejercer sus efectos regulatorios. La diabetes tipo II está asociada a obesidad y dietas ricas en azúcares. El número de individuos afectados a nivel mundial se incrementó en 10 veces en el periodo 1982-1994 y se estima que para el año 2030, el número de personas afectadas sea de 366 millones (Millward et al., 2010). Se ha descrito que la sustitución Leu184Val en PCK1 humana (Dong et al., 2009) está asociada a un riesgo de diabetes y obesidad en una población china. Aunque hay otras sustituciones descritas en el gen de la PCK1, apenas se conocen sus efectos. Aunque se ha visto que los individuos diabéticos presentan generalmente niveles elevados de PCK1 (Beale et al., 2004), no es así en todos casos (Samuel et al., 2009). No obstante, la obesidad induce un estado inflamatorio crónico que hace a los tejidos resistentes a la acción de la insulina (Millward et al., 2010). La consecuencia es que la expresión de PCK1 no es reprimida (Chakravarty and Hanson, 2007) y se produce una mayor síntesis de triglicéridos que se depositan en el tejido adiposo, incrementan el nivel de obesidad en el individuo y agravan el problema (Franckhauser et al., 2002). En animales diabéticos, el silenciamiento de *PCK1* consigue mejorar la glucemia durante el ayuno, pero produce alteraciones en el nivel de

triglicéridos en sangre (Gómez-Valadés et al., 2008) como consecuencia del posible papel integrador de PCK1, es decir, coordinar el flujo de metabolitos para perfecto funcionamiento del ciclo de Krebs (Burgess et al., 2007; She et al., 2000, 2003).

También se ha observado que PCK1 está sobreexpresada en cáncer colorrectal (Montal et al., 2015). Según estos autores, la PCK1 proporcionaría PEP que sería derivado para la formación de nucleótidos que permitiesen la replicación del DNA de la célula tumoral, especialmente en condiciones de baja glucosa, y en condiciones de alta glucosa la PCK1 estaría proporcionando metabolitos al ciclo de Krebs favoreciendo la glicólisis. En conclusión, dado que la diabetes y el cáncer presentan como denominador común la obesidad (Garg et al., 2014), el conocimiento del papel metabólico y los mecanismos de regulación de la PCK1 pueden contribuir al conocimiento de estas enfermedades y el desarrollo de terapias.

2. Material y métodos

2.1. Muestras animales

2.1.1. Muestras de origen porcino

El DNA para la secuenciación de *Pck1* porcina se obtuvo a partir de muestras de semen de animales de raza Piètrain provenientes de Agropecuaria Obanos S.A. (Marcilla, España). Las muestras de músculo provenientes de cerdos de raza ibérica fueron cedidas por la Dra. Carmen García (Universidad de Extremadura, España) y las provenientes de animales del cruce Duroc x Landrace/Large White fueron cedidos por PORTESA (Teruel, España). También se incluyeron muestras de animales de raza Duroc cedidos por Censyra (Badajoz, España), PORTESA (Teruel, España) y la Dra. Noelia Ibáñez Escriche (IRTA, Lérida, España). Las muestras de jabalí fueron proporcionadas por cazadores pertenecientes a nuestros departamentos.

Los estudios de asociación de las mutaciones c.A2456C de *Pck1* y c.T1378A de *Pgc1 α* se realizaron utilizando muestras provenientes de 202 animales (machos castrados y hembras) provenientes del cruce de 9 machos y 32 hembras de raza Duroc x Landrace/Large White que se llevó a cabo en una granja experimental. Los animales fueron criados atendiendo a la normativa sanitaria y de bienestar animal vigentes y alimentados *ad libitum* utilizando dietas estándar. Los animales con un peso de 114.5 \pm 10.98 Kg fueron sacrificados bajo supervisión veterinaria.

2.1.2. Muestras de tejido hepático y renal de ratón

Las muestras animales fueron cedidas por el Dr. Lindsay Wu (New South Wales University, Australia). Se utilizaron ratones *Sirt1*^{-/-} inducibles descritos en un trabajo anterior (Price et al., 2012). Los animales se sacrificaron tras un ayuno de 4 horas. Las muestras de hígado y riñón fueron pulverizadas en un Cellcrusher (Cellcrusher, Portland, OR, EEUU) en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C.

2.2. Análisis de los caracteres fenotípicos de muestras de origen porcino

Los datos fenotípicos de la población estudiada en el presente trabajo provienen de un trabajo anterior (Reina et al., 2012).

2.3. Secuenciación de la región codificante del gen *Pck1* porcino

2.3.1. Extracción del DNA genómico a partir de muestras de tejido

El DNA se extrajo de muestras de folículo de pelo de 27 cerdos usando Real Pure genomic DNA extraction kit (Durviz, Valencia, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadió proteinasa K (20 mg/mL) a 55°C durante 5 horas. El DNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU).

2.3.2. Secuenciación de la región codificante del gen *Pck1* porcino

Para la región codificante del gen *Pck1* porcino se utilizaron las parejas de cebadores de la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Parejas de cebadores utilizados para la amplificación de la región codificante del gen <i>Pck1</i> porcino.		
Nombre del cebador	Secuencia	Amplicón (bp*)
PEPCK1F PEPCK2R	5'-GCGACCTTGGCATCCACACCCCTTA-3' 5'-TTTAAAGCTCGCTGAGGCCACGGG-3'	1026
PEPCK2F PEPCK3R	5'-GTGTTGTCCAAGGGGGATCAGGAGGA-3' 5'-CCCCCTGCCTCGCACATTTAGGAT-3'	896
PEPCK3F PEPCK4R	5'-GCACCCTCCTAGGCCAAAGCATTG-3' 5'-ACAGCCAGAGAGAAGACGCCCTGA-3'	961
PEPCK4F PEPCK5R	5'-GGGCATCAAGCTCACTTCTGGAA-3' 5'-ACACACAGAGAAGAAAGGGCAGCG-3'	790
PEPCK5F PEPCK8R	5'-TCCCCGCATCCCTCTGTACGTGTA-3' 5'-CCAGAGACCCTGTGCCTGCGTGTC-3'	813
*bp = pares de bases		

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Biometra UNO-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Alemania) utilizando AccuPrime™Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). La composición de la reacción fue la siguiente (Tabla 2.2):

Tabla 2.2. Componentes de la reacción de PCR para secuenciar las regiones promotora y codificante de <i>Pck1</i> porcino.	
Reactivo	Volumen (μL)
Buffer II 10x	5
Cebador F (sentido 5' a 3') (20 μM)	0.5
Cebador R (antisentido, 3' a 5') (20 μM)	0.5
DMSO (100%)	3.8
AccuPrime™Taq DNA Polymerase (1 U/μL)	1
DNA genómico (100 ng/μL)	2
H ₂ O	37.2
Volumen total	50

La reacción se llevó a cabo en las siguientes etapas (Tabla 2.3):

Tabla 2.3. Etapas de la reacción de PCR.			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización	94	120	1
Desnaturalización	94	30	35
Hibridación	53/55*	30	
Extensión	68	60/75/90**	
Extensión final	68	600	1

* Temperatura de hibridación: 53°C se utilizaron cuando la reacción contenía la pareja primer PEPCK4F/R5. 55°C se utilizaron en el caso de las parejas de cebadores PEPCK 1F/2R, PEPCK2F/3R, PEPCK33/4R, PEPCK5F/8R.

** Tiempo de extensión: 60 segundos de extensión se aplicaron en el caso de las parejas PEPCK 4F/5R and PEPCK5F/8R, 75 segundos en el caso de las parejas PEPCK2F/3R y PEPCK3F/4R y 90 segundos con la pareja PEPCK1F/2R.

Finalizadas las reacciones, se tomó una alícuota para comprobar la correcta amplificación en un gel de agarosa al 2%. El DNA restante se purificó utilizando NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración del DNA y se envió a Sistemas Genómicos S. L. (Valencia, España) para ser secuenciado. Las secuencias

obtenidas se ensamblaron usando Vector NTI (Life technologies, Waltham, MA, EEUU) y se alinearon utilizando Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

2.4. Genotipado de la población Duroc x Landrace/Large White

Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Carmen Burgos (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España). El genotipo se analizó para cada individuo de la población de 202 animales Duroc x Landrace/Large White.

2.4.1. Genotipado del polimorfismo c.A2456C del gen *Pck1* porcino

La detección del polimorfismo c.A2456 se realizó mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) utilizando un fragmento previamente amplificado por PCR convencional utilizando las condiciones detalladas en las Tabla 2.2 y Tabla 2.3, con los cebadores PEPCK2F y PEPCK3R (Tabla 2.1). El producto de PCR se purificó utilizando NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La técnica de RT-PCR permite discriminar polimorfismos utilizando sondas marcadas con distintos fluorocromos. Estas sondas emiten luz a determinadas longitudes de onda y permiten distinguir los individuos homocigotos para el gen de interés entre sí y, además, detectar heterocigotos como ha sido descrito previamente (Carrodeguas et al., 2005). En la reacción, los cebadores fueron SSPEPCKE4-F (5'-CGCTGCCCCCTGCT-3') y SSPEPCKE4-R (5'-CCCATGCTGAACGGGATGA-3') y las sondas fluorescentes usadas SSPEPCKE4-V (5'-AGGTCGCACGATGTAT-3') y SSPEPCKE4-M (5'-AGGTCGCACGCTGTAT-3') contenían los fluorocromos VIC y FAM, respectivamente. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador ABI-PRISM 7000 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) en un volumen final de 25 µL y consistió en 12.5 µL de Taqman Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EEUU), 0.6 µL de las sondas Taqman (40x), 10 ng de DNA y agua hasta alcanzar el volumen final. El programa de PCR que se siguió fue el mostrado en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Etapas de la reacción de RT-PCR.			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización	95	600	1
Amplificación	92	15	50
	61	60	

2.4.2. Genotipado del polimorfismo c.T1378A del gen *Pgc1α* porcino

Para el genotipado de este polimorfismo la reacción de PCR se realizó siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 2.2 y en la Tabla 2.3, utilizando los cebadores descritos previamente (Kunej et al., 2005). El DNA se purificó y se secuenció en Sistemas Genómicos S.L. La identificación del genotipo se obtuvo por análisis de los cromatogramas.

2.5. Análisis estadísticos para la determinación de efectos sobre el fenotipo de las sustituciones c.A2456C de *Pck1* y c.T1378A de *Pgc1α* en la población Duroc x Landrace/Large White

Esta sección se llevó a cabo gracias a la colaboración con el Dr. Luis Varona (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España). Los estudios de asociación son análisis estadísticos que permiten conocer si un determinado polimorfismo puede ser responsable de parte de la variación observada entre los individuos de una determinada población. Para ello es necesario la existencia de una variabilidad del polimorfismo en dicha población y que los caracteres fenotípicos de interés sean analizados. De esta forma se calcula la probabilidad de que un determinado polimorfismo esté asociado a un efecto sobre el fenotipo.

2.5.1. Estudio de asociación sobre el polimorfismo del gen *Pck1*

Los estudios de asociación se llevaron a cabo de manera independiente para cada carácter utilizando un método Bayesiano. La probabilidad Bayesiana asumida fue:

$$p(\mathbf{y}|\mathbf{b}, \mathbf{p}, \mathbf{u}, \sigma_e^2) = \prod_{i=1}^n \frac{1}{(2\pi\sigma_e^2)} \exp\left(-\frac{y_i - \mathbf{x}_i\mathbf{b} - \mathbf{w}_i\mathbf{p} - \mathbf{z}_i\mathbf{u}}{2\pi\sigma_e^2}\right)$$

Donde \mathbf{y} es el vector de los datos fenotípicos, \mathbf{b} es el vector de los efectos sistemáticos incluyendo: covariadas con la edad y el efecto de la sustitución del polimorfismo analizado, un efecto lote y un efecto sexo. \mathbf{p} representa el vector del efecto camada y \mathbf{u} el de efectos poligénicos. Además, \mathbf{x}_i , \mathbf{w}_i y \mathbf{z}_i son las filas de las matrices de incidencia (\mathbf{X} , \mathbf{W} y \mathbf{Z}) de los fenotipos y σ_e^2 es la varianza residual. La distribución anterior para los efectos camada y poligénico siguieron la siguiente distribución Gaussiana multivariable (MVN): $p(\mathbf{p}|\sigma_p^2) = MVN(0, I \sigma_p^2)$ y $p(\mathbf{u}|\sigma_a^2) = MVN(0, A \sigma_a^2)$, siendo σ_p^2 y σ_a^2 las varianzas aditivas de los efectos camada y poligénico, respectivamente. Se asumió que las distribuciones anteriores para los efectos sistemáticos y los componentes de la varianza eran uniformes dentro de los límites apropiados. El análisis se llevó a cabo con el programa TM (Legarra et al., 2011). Se realizaron 500.000 iteraciones mediante un muestreo Gibbs (Gelfand and Smith, 1990), descartando las primeras 25.000. Finalmente, se calcularon las probabilidades posteriores por encima de cero. Se consideraron relevantes aquellas distribuciones posteriores cuya probabilidad por encima de cero fue superior a 0.9 o inferior a 0.1.

2.5.2. Estudio de epistasis sobre los polimorfismos de los genes *Pg1α* y *Pck1*

El análisis estadístico para la determinación de efectos aditivo y aditivo x aditivo se llevó a cabo con un modelo lineal Bayesiano. El modelo fue el siguiente:

$$\mathbf{y} = \mathbf{w}\mathbf{b} + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{T}\mathbf{p} + \boldsymbol{\lambda}_{Pg1\alpha}\mathbf{a}_{Pg1\alpha} + \boldsymbol{\lambda}_{axa}\mathbf{i}_{axa} + \mathbf{e}$$

Donde \mathbf{y} es el vector de datos fenotípicos, \mathbf{b} es la covariada del peso al sacrificio, $\boldsymbol{\beta}$ es el vector que representa el efecto lote, \mathbf{u} el vector de los efectos aditivos poligénicos, \mathbf{p} el vector del efecto camada, $\mathbf{a}_{Pg1\alpha}$ y \mathbf{a}_{Pck1} son los efectos aditivos para *Pg1α* y *Pck1*, respectivamente, \mathbf{i}_{axa} es el efecto de la interacción epistática aditiva x aditiva y \mathbf{e} es el vector de efectos residuales. Además, \mathbf{w} representa el vector del peso vivo al sacrificio, \mathbf{X} , \mathbf{Z} y \mathbf{T} son las matrices de incidencia que vinculan los efectos sistemáticos y poligénicos con los datos $\boldsymbol{\lambda}_{Pg1\alpha}$, $\boldsymbol{\lambda}_{Pck1}$ y $\boldsymbol{\lambda}_{axa}$ son los vectores de los coeficientes del efecto aditivo y

aditivo x aditivo calculados con la aproximación ortogonal propuesta en un trabajo anterior (Alvarez-Castro and Carlborg, 2007). El modelo Bayesiano asumió una distribución limitada y uniforme para la covariada, \mathbf{b} , los efectos sistemáticos, $\boldsymbol{\beta}$, y los efectos aditivos y aditivo x aditivo ($\mathbf{a}_{p_{gc1\alpha}}$, $\mathbf{a}_{p_{ck1}}$ y \mathbf{i}_{axa}) semejante al modelo propuesto por otros autores (Park and Casella, 2008). Las distribuciones asumidas para las distribuciones Gaussianas de los efectos poligénico (\mathbf{u}) y camada (\mathbf{p}) fueron: $\mathbf{u} \sim N(0, A\sigma_a^2)$ y $\mathbf{p} \sim N(0, I\sigma_p^2)$. Donde \mathbf{A} es la matriz numeradora de relación calculada a partir de la información del pedigrí e \mathbf{I} la matriz identidad. Finalmente, las distribuciones anteriores de los componentes de varianza σ_p^2 y σ_a^2 fueron uniformes. El análisis se llevó a cabo mediante un muestreo Gibbs igual al mencionado en el punto 2.5.1. por medio de 100.000 iteraciones de las cuales se descartaron las primeras 10.000 para el cálculo de las distribuciones posteriores. Igualmente, se consideraron relevantes aquellas distribuciones posteriores cuya probabilidad por encima de cero fue superior a 0.9 o inferior a 0.1.

2.6. Clonaje de los distintos insertos en plásmidos de expresión

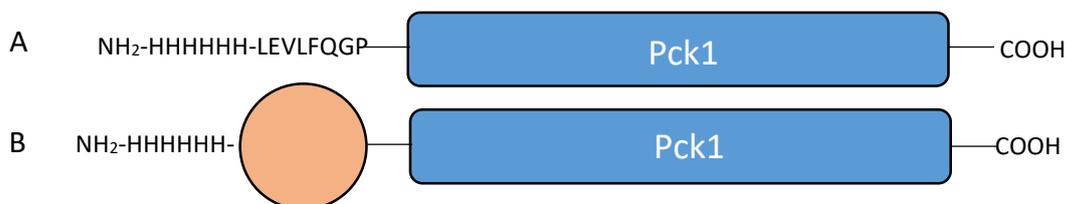
Para expresar las distintas proteínas tanto en bacterias como en células eucariotas se introdujo el gen codificante de cada proteína en un plásmido (o vector) de expresión. Estos plásmidos son moléculas circulares de DNA bicatenario que presentan secuencias de nucleótidos que son reconocidos por enzimas de restricción y permiten, como se explicará más adelante, introducir genes y generar una molécula recombinante. Estas secuencias o sitios de restricción son específicos del plásmido, aunque muchos plásmidos pueden presentar sitios reconocidos por la misma enzima. Los plásmidos de expresión pueden ser monocistrónicos o policistrónicos, permitiendo la expresión de uno o más genes, respectivamente. Para su uso en biología molecular, además de expresar el gen o genes de interés, los plásmidos incluyen genes de resistencia a antibióticos permitiendo la selección de las bacterias que los han incorporado.

2.6.1. Obtención de los insertos a clonar

El gen *Pck1* porcino se obtuvo a partir de muestras de mRNA de un trabajo anterior. A partir de este mRNA se obtuvo el cDNA total utilizando Cells to cDNA kit (Ambion, Waltham, MA, USA) por medio de una retrotranscriptasa o transcriptasa reversa y siguiendo las indicaciones del fabricante. El gen que codifica la Pck1 de rata (*Rattus norvegicus*, ORa12170) y Pgc1 α p.C430S porcina (OSe00030D) fueron comprados en GenScript (Piscataway, NJ, EEUU).

2.6.2. Plásmidos de expresión para expresar proteína en cepas de *E. coli*

Los plásmidos de expresión utilizados en este trabajo poseen un promotor T7 reprimido que se activa en presencia de IPTG, permitiendo la expresión del gen insertado. Para la expresión de proteína en bacterias se utilizaron distintas cepas de *Escherichia coli* que se especificarán más adelante. Los plásmidos que se utilizaron para los distintos clonajes fueron: pCDF-Duet1 (Novagen, Billerica, MA, EEUU), pET15b-PP y pET22b-SUMO; estos dos últimos cortesía del Dr. Ramón Hurtado Guerrero (BIFI, Zaragoza, España). El producto de la expresión de estos plásmidos en *E. coli* aparece reflejado en el siguiente esquema (Esquema 2.1).



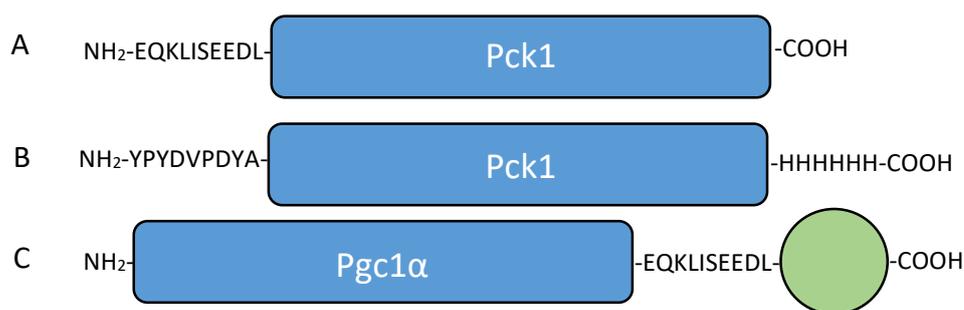
Esquema 2.1. Representación gráfica de los productos de la expresión en *E. coli* para insertos clonados en (A) pCDF-Duet1 y pET15bPP y (B) pET22b-SUMO. La proteína resultante aparece representada desde su extremo amino/N-terminal (NH₂) hasta el carboxilo/C-terminal (COOH), HHHHHH representa la cola de 6 histidinas que incorpora el propio plásmido, en el círculo naranja aparece representada la proteína de fusión SUMO y en el rectángulo azul aparece representada la proteína de interés. La secuencia LEVLFQGP representa la secuencia reconocida por la proteasa PreScission Protease.

Como puede apreciarse en el Esquema 2.1, todas las construcciones se diseñaron incluyendo una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. Las colas de histidinas tienen afinidad por metales como el níquel (Ni²⁺) o el cobalto (Co²⁺),

facilitando el proceso de purificación que más adelante se detallará. Tanto las construcciones del pCDF-Duet1 como las del pET15bPP incluyen una secuencia de aminoácidos (LEVLFGQP) en el extremo N-terminal de la proteína. Esta secuencia es reconocida de modo específico por una proteasa (PreScission Protease) que corta entre glutamina (Q) y glicina (G), dejando a un lado la cola de histidinas y al otro la proteína de interés con glicina y prolina en el extremo amino. El pET22b-SUMO, además de incluir una cola de histidinas, incluye la secuencia que codifica la proteína de 12 kDa SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) de *Saccharomyces cerevisiae*, como proteína de fusión. Al igual que sucede con otras proteínas de fusión, se ha visto que esta proteína puede facilitar la expresión de otras y aumentar su solubilidad. Esta proteína es reconocida por la proteasa ULP1 (Ubiquitin-Like-specific Protease 1) que permite separar SUMO de la proteína de interés.

2.6.3. Plásmidos de expresión para expresar proteína en células de mamífero

En el caso de la expresión de proteínas en células eucariotas se utilizaron plásmidos que contenían el promotor del citomegalovirus (CMV) que expresa constantemente el gen introducido. Los plásmidos utilizados fueron el pCMV-Myc, el pCMV-HA y el pEGFP-N1. Estas construcciones se diseñaron para obtener los siguientes productos (Esquema 2.2).



Esquema 2.2. Representación gráfica de los productos de la expresión en células eucariotas clonados en (A) pCMV-myc, (B) pCMV-HA y (C) pEGFP-N1. La proteína resultante aparece representada desde su extremo amino terminal (NH₂) hasta el carboxilo terminal (COOH), la etiqueta EQKLISEEDL representa el epítipo myc, la etiqueta YPYDVPDYA representa el epítipo de la hemaglutinina (HA), HHHHHH representa la cola de 6 histidinas, el círculo verde representa la proteína de fusión Green Fluorescent Protein (GFP) y el rectángulo azul representa la proteína de interés.

En las tres construcciones se añadió una etiqueta (myc o HA) para la detección de la proteína por western blot, utilizando anticuerpos anti-myc o anti-HA. Inicialmente en la construcción de pEGFP-N1, se añadió un codón de terminación (TAA) antes de la secuencia que codifica la Green Fluorescent Protein (GFP). La GFP se incluyó para poder localizar las isoformas de Pgc1 α por medio de microscopía de fluorescencia sin necesidad de utilizar anticuerpos (inmunohistoquímica).

2.6.4. Elaboración de las construcciones

En la Tabla 2.5, se detalla el nombre, la proteína codificada y la especie, así como el plásmido hospedador, la resistencia antibiótica del plásmido y la etiqueta con la que se marcaron las proteínas. Las construcciones pPLM se usaron para expresión de proteína en *E. coli* y las pCMP para expresión en células eucariotas.

Tabla 2.5. Construcciones utilizadas en este trabajo.					
Clon	Proteína codificada	Especie	Plásmido	Resistencia	Etiqueta
pPLM3	Pck1	Cerdo	pET15b-PP	Ampicilina	N-His
pPLM7	Pck1	Rata	pET22b-SUMO	Ampicilina	N-His
pPLM12	N-Pig (1-259)-C-Rat (260-622) Pck1	Cerdo/Rata	pET15b-PP	Ampicilina	N-His
pPLM13	N-Pig (1-259)-C-Rat (260-622) Pck1p.M139L	Cerdo/Rata	pET15b-PP	Ampicilina	N-His
pPLM27	Pck1	Rata	pCDF-Duet1	Estreptomicina	N-His
pCMP3	Pck1	Cerdo	pCMV-Myc	Ampicilina	N-Myc
pCMP16	Pgc1 α p.C430S	Cerdo	pEGFP-N1	Kanamicina	C-Myc
pCMP23	Pck1	Rata	pCMV-HA	Ampicilina	N-HA/C-His

2.6.4.1. Amplificación de los fragmentos por PCR

En primer lugar, se diseñaron las reacciones de PCR para amplificar el fragmento que se quería introducir en el plásmido. En la Tabla 2.6 se detallan los cebadores utilizados. Algunos de estos cebadores son comunes a varios clonajes. Las secuencias de corte reconocidas por enzimas de restricción aparecen subrayadas. La secuencia del epítipo myc en pCMP16 y la de la cola de histidinas de pCMP23 aparecen resaltadas en cursiva. En todos los cebadores se incluye la secuencia 5'-CTAGGATC-3' que no es reconocible por ninguna enzima de restricción. Esta secuencia es necesaria antes del sitio de restricción ya que las nucleasas necesitan un número mínimo de nucleótidos en el extremo 5' y 3' para realizar el corte eficazmente. Este número es variable, pero es

siempre inferior a los 8 nucleótidos de la secuencia que se añadió. Para los clones pPLM27 y pCMP23 se utilizó otra metodología que no requiere dos sitios de corte y que se detallará más adelante. Para la construcción pCMP23 se utilizaron dos cebadores ya que se utilizó un plásmido previamente digerido con esas enzimas. Los cebadores cuyo nombre incluye la denominación “-F” amplifican la cadena codificante del gen mientras que los que contienen la denominación “-R” amplifican la cadena complementaria.

Tabla 2.6. Cebadores utilizados para la amplificación de los insertos para clonar. Los sitios de restricción aparecen subrayados y la secuencia que codifica la cola de histidinas en cursiva.

Clon	Nombre	Secuencia	Enzima 5'	Enzima 3'	Tamaño (bp)*
pPLM3	PCK1SsNdeI-F PCK1SsXhoI-R	5'-CTAGGATCC <u>CATATGCCTCCTCAGCTCTCAAACGGCC</u> -3' 5'-CTAGGATCC <u>CTCGAGT</u> CACATCTGGCTGATTCTCT-3'	NdeI	XhoI	7601
pPLM7	PCK1RnBamHI-F PCK1RnSall-R	5'-CTAGGATCGA <u>ATT</u> CGGATGCCTCCTCAGCTGCATAA-3' 5'-CTAGGATCGT <u>CGAGT</u> TACATCTGGCTGATTCTC-3'	BamHI	Sall	7695
pPLM12	PCK1SsNdeI-F PCK1RnXhoI-R	5'-CTAGGATCC <u>CATATGCCTCCTCAGCTCTCAAACGGCC</u> -3' 5'-CTAGGATCC <u>CTCGAGT</u> TACATCTGGCTGATTCTC-3'	NdeI	XhoI	7601
pPLM13	PCK1SsNdeI-F PCK1RnXhoI-R	5'-CTAGGATCC <u>CATATGCCTCCTCAGCTCTCAAACGGCC</u> -3' 5'-CTAGGATCC <u>CTCGAGT</u> TACATCTGGCTGATTCTC-3'	NdeI	XhoI	7601
pPLM27	PCK1RnBamHI	5'-CTAGGATCGA <u>ATT</u> CGGATGCCTCCTCAGCTGCATAA-3'	BamHI	-	5680
pCMP3	PCK1SsEcoRI-F PCK1SsXhoI-R	5'-CTAGGATCGA <u>ATT</u> CGTATGCCTCCTCAGCTCTCAA-3' 5'-CTAGGATCC <u>CTCGAGT</u> CACATCTGGCTGATTCTCT-3'	EcoRI	XhoI	5662
pCMP16	PGCSsXhoI-F PGCSsBamHI-R	5'-CTAGGATACTCGAGATGGCGTGGGACATGTGCAAC-3' 5'-CTAGGATAGGATCCTTACAGATCCTCTTCTGAG ATGAGTTTTGTTCCCTGCGCAAGCTTCTCTG-3'	XhoI	BamHI	7152
pCMP23	PCK1RnSall-F PCK1RnXhoI-R	5'-CCATGGAGGCCCGA <u>ATT</u> CGGATGCCTCCTCAGCTGCAT-3' 5'-ATCCCCGCGGCCGCGGTACCTTAATGATGATGA TGATGATGCTGGCTGATTCTCTGTTTC-3'	Sall	XhoI	5666

*Tamaño en pares de bases (bp) de la construcción final.

Los insertos para los diferentes clonajes se amplificaron utilizando Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones aparecen en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Componentes de la reacción PCR para amplificar los insertos de los clonajes.	
Reactivo	Volumen (μL)
Pfu Ultra II reaction Buffer 10x	5
dNTPs (25 mM cada uno)	0.5
Cebador F (sentido 5' a 3') (10 μM)	1
Cebador R (antisentido, 3' a 5') (10 μM)	1
DMSO (100%)	2.5
Pfu Ultra II DNA polymerase (1 U/ μL)	1
DNA del inserto purificado (100 ng/ μL)	1
H ₂ O	38
Volumen total	50

Las PCR se llevaron a cabo en las siguientes condiciones (Tabla 2.8):

Tabla 2.8. Etapas de la reacción de PCR para la amplificación de insertos.			
Etapas	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización	95	120	1
Desnaturalización	95	20	40
Hibridación	60	20	
Extensión	72	75/90*	
Extensión final	72	180	1

* Tiempo de extensión: 75 segundos se utilizaron para la amplificación del gen *Pck1* (1869 bp) y 90 segundos para la amplificación del gen *Pgc1 α* (2391 bp).

2.6.4.2. Digestión de los plásmidos y los insertos

Una vez amplificados mediante PCR, los insertos se purificaron utilizando NucleoSpin[®] Extract II kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos y los insertos se digirieron entonces con las correspondientes enzimas de restricción a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas. Las enzimas utilizadas fueron compradas a New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU) y generaron extremos cohesivos, aquellos que presentan una región monocatenaria pequeña en el DNA que puede unirse a su complementaria. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 μL y contenían: tampón de reacción (el recomendado por el fabricante para cada par de enzimas), 10 unidades de cada una de las enzimas de restricción, 2 μg de DNA (plásmido o inserto) y agua hasta alcanzar un volumen final de 20 μL . Tras la digestión, todo el DNA se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El fragmento resultante se extrajo del gel y se

purificó utilizando NucleoSpin® Extract II kit. Una alícuota de los plásmidos y los insertos digeridos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se determinó así tanto la calidad como la cantidad, comparando la intensidad de las bandas con la de marcadores de peso molecular con tamaño conocidos.

2.6.4.3. Ligación de los insertos con su plásmido

Finalmente, se llevó a cabo la ligación de los insertos con los correspondientes plásmidos previamente digeridos. Para ello se utilizó la ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Las reacciones incluyeron plásmido e inserto en una ratio molecular 1:3, respectivamente, 4 µL de tampón (5x) para la ligasa, 5 unidades de ligasa y agua hasta un volumen final de 20 µL. La reacción se incubó a 16°C durante 18 horas.

En el caso de los clones pPLM27 y pCMP23, se siguieron los mismos pasos salvo que la digestión sólo se llevó a cabo sobre el plásmido y para la ligación se utilizó Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). Los cebadores fueron diseñados para este sistema que se basa en la capacidad de las moléculas de DNA para recombinarse en aquellas regiones donde solapan. La mezcla incluye una exonucleasa que elimina los extremos 5' que solapan y permite la hibridación de los fragmentos, una polimerasa que añade los nucleótidos faltantes tras la unión de fragmentos y una ligasa que termina de unir los fragmentos. El resultado es una única molécula de DNA totalmente sellada. Esta reacción se llevó a cabo en un volumen final de 5 µL utilizando 2.5 µL del tampón (2x), plásmido e inserto en una relación 1:3 y agua hasta alcanzar el volumen final. La mezcla se incubó 15 minutos a 50°C en un termociclador MJ Mini (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). En ambos tipos de ligación uno de los tubos se usó de control, es decir, se añadieron todos componentes salvo el inserto.

2.6.4.4. Transformación en *E. coli* DH5α

La transformación es el proceso de introducción de plásmidos dentro de bacterias. Las *E. coli* DH5α son una cepa bacteriana que amplifica a un gran número de copias del

plásmido introducido, aumentando el rendimiento de las purificaciones de plásmidos. Como se mencionó anteriormente, los plásmidos presentan genes de resistencia a antibióticos y esto permite seleccionar aquellas bacterias portadoras del plásmido deseado. En este trabajo, salvo que se especifique de otra manera, se utilizaron cepas bacterianas químicamente competentes, preparadas en presencia de CaCl_2 . El protocolo general que se siguió fue el siguiente:

- Las células, 100 μL con una $\text{OD}_{600} \sim 0.3$, se descongelaron a 4°C sobre hielo.
- Se añadió DNA. En este caso 10 μL del producto de la ligación mencionada en el punto anterior. 1 μL de producto en el caso de las ligaciones producidas con el sistema Gibson.
- Se incubó la mezcla de bacterias y DNA a 4°C durante 30 minutos.
- Tras la incubación, las bacterias se transformaron por choque térmico introduciendo los tubos en un baño a 42°C durante 1 minuto. Pasado ese tiempo los tubos se introdujeron en hielo inmediatamente.
- Pasados unos 2 minutos se añadió medio Luria-Bertani (LB) hasta un volumen final de 1 mL. Las bacterias se incubaron a 37°C y 200 rpm en un incubador orbital durante 1 hora.
- 200 μL de estas bacterias se sembraron en placas de LB-agar que contenían el antibiótico específico para el cual cada plásmido presentaba resistencia y permitió seleccionar los clones bacterianos portadores de cada plásmido. Las placas se incubaron una noche a 37°C .

En la siguiente tabla se resumen las concentraciones de los distintos antibióticos que se utilizaron en este trabajo (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Relación de antibióticos y concentraciones durante los experimentos con cepas de <i>E. coli</i> .	
Antibiótico	Concentración*(µg/mL)
Ampicilina	200
Kanamicina	50
Estreptomicina	50
Cloranfenicol	35
* Tanto en medio líquido como en agar.	

2.6.4.5. Extracción y secuenciación de las construcciones

Se tomaron colonias con una punta de pipeta y se incubaron en 10 mL de medio líquido LB con el correspondiente antibiótico en un incubador orbital a 37°C y 250 rpm, toda una noche. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 6000 g. Los plásmidos se extrajeron utilizando Plasmid DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Ping-Tung, Taiwán), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se cuantificaron por espectrofotometría y una alícuota de unos 200 ng de cada colonia se digirió con las mismas enzimas de restricción que se usaron durante el proceso de clonaje con el fin de separar el plásmido y el inserto de nuevo. El producto de la digestión se resolvió en un gel de agarosa al 1% y se seleccionó para secuenciar el DNA de las colonias que liberó el inserto. El DNA de las muestras positivas se envió a secuenciar a Sistemas Genómicos S. L. Se analizó tanto la integridad de la secuencia del inserto como la de la pauta de lectura. Una fracción de 500 µL de células se reservó para conservar como “stock” de glicerol -80°C en presencia de glicerol al 30%.

2.6.4.6. Mutagénesis dirigida

Los clones anteriormente descritos sirvieron para elaborar diferentes mutantes por medio de mutagénesis dirigida. Brevemente, este proceso incorpora mutaciones que pueden ser inserciones, deleciones o sustituciones por medio de una PCR que utiliza cebadores que incluyen dichas modificaciones. A diferencia de la PCR convencional, el sustrato de la polimerasa es la construcción (plásmido e inserto) circular ya constituida,

resultando en un proceso de amplificación lineal en lugar de exponencial. En la Tabla 2.10 se recogen las construcciones obtenidas por medio de esta técnica.

Tabla 2.10. Relación de construcciones generadas por mutagénesis dirigida.			
Clon	Proteína codificada	Especie	Origen
pPLM4	Pck1 p.M139L	Cerdo	pPLM3
pPLM8	Pck1 p.M139L	Rata	pPLM7
pPLM9	Pck1-WT-NheI nt 753	Cerdo	pPLM3
pPLM10	Pck1 p.M139L-NheI nt 753	Cerdo	pPLM4
pPLM11	Pck1-WT-NheI nt 753	Rata	pPLM7
pPLM19	Pck1 p.K70Q	Rata	pPLM7
pPLM20	Pck1 p.K71Q	Rata	pPLM7
pPLM21	Pck1 p.K91Q	Rata	pPLM7
pPLM22	Pck1 p.K124Q	Rata	pPLM7
pPLM23	Pck1 p.K316Q	Rata	pPLM7
pPLM24	Pck1 p.K521Q	Rata	pPLM7
pPLM25	Pck1 p.K524Q	Rata	pPLM7
pPLM26	Pck1 p.K594Q	Rata	pPLM7
pPLM28	Pck1 p.K91AcK	Rata	pPLM27
pPLM29	Pck1 p.K473AcK	Rata	pPLM27
pPLM30	Pck1 p.K521AcK	Rata	pPLM27
pPLM37	Pck1 p.S90E+K91AcK	Rata	pPLM28
pCMP4	Pck1 p.M139L	Cerdo	pCMP3
pCMP6	Pck1 p.K14A	Cerdo	pCMP3
pCMP7	Pck1 p.M139L-K14A	Cerdo	pCMP4
PCMP17	Pgc1 α salvaje	Cerdo	pCMP16
pCMP20	Pgc1 α p.C430S-GFP	Cerdo	pCMP16
pCMP21	Pgc1 α -GFP	Cerdo	pCMP16
pCMP26	Myc-6xHis-Pck1	Cerdo	pCMP3
pCMP27	Myc-6xHis-Pck1 p.M139L	Cerdo	pCMP4
pCMP28	Pck1 p.S90A	Rata	pCMP23
pCMP29	Pck1 p.T92A	Rata	pCMP23

Para las reacciones de PCR se utilizaron los siguientes cebadores (Tabla 2.11 y Tabla 2.12).

Tabla 2.11. Relación de oligonucleótidos usados para las generar construcciones por mutagénesis dirigida en plásmidos de expresión bacteriana. Los nucleótidos modificados por el cebador aparecen subrayados. Los cebadores cuyo nombre incluye la denominación “-F” amplifican la hebra codificante de la construcción mientras que los que contienen la denominación “-R” amplifican la hebra complementaria de la construcción.

Clon	Nombre	Secuencia	Cambio	Objetivo
pPLM4	SsPck1M139L-F SsPck1M139L-R	5'-GACCAAATCCACAT <u>CT</u> GCGATGGCTCCGAGG-3' 5'-CCTCGGAGCCATCGCAGATGTGGATTGGTC-3'	ATG→CTG	Mutación M139L
pPLM8	RnPck1M139L-F RnPck1M139L-R	5'-GAAAGGCCGCACCC <u>CT</u> GTATGTCATCCATTAG-3' 5'-GCTGAATGGGATGACATACA <u>GG</u> GTGCGGCCTTTC-3'	ATG→CTG	Mutación M139L
pPLM9	SsHybrid-NheI-F SsHybrid-NheI-R	5'-GCCCTGAGGAT <u>GG</u> GCTAGCCGGCTGGCCAAG-3' 5'-CTTGCCAGCCGGCTAG <u>CC</u> CATCCTCAGGGC-3'	GCC→GCT	Incluir sitio de restricción NheI
pPLM10	SsHybrid-NheI-F SsHybrid-NheI-R	5'-GCCCTGAGGAT <u>GG</u> GCTAGCCGGCTGGCCAAG-3' 5'-CTTGCCAGCCGGCTAG <u>CC</u> CATCCTCAGGGC-3'	GCC→GCT	Incluir sitio de restricción NheI
pPLM11	RnHybrid-NheI-F RnHybrid-NheI-R	5'-GCGCTGCGGAT <u>CG</u> CTAGCAGGCTGGCTAAG-3' 5'-CTTAGCCAGCCTGTAG <u>CG</u> GATCCGCAGCGC-3'	GCC→GCT	Incluir sitio de restricción NheI
pPLM19	RnPck1K70Q-F RnPck1K70Q-R	5'-CATCCGCAAGCTG <u>CA</u> GAAATATGACAACTG-3' 5'-CAGTTGTCATATT <u>CT</u> G <u>CA</u> GCTTGCGGATG-3'	AAG→CAG	Mutación K70Q
pPLM20	RnPck1K71Q-F RnPck1K71Q-R	5'-CATCCGCAAGCTGAAG <u>CA</u> AATATGACAACTGTTGG-3' 5'-CAACAGTTGTCATATT <u>CT</u> T <u>CA</u> GCTTGCGGATG-3'	AAA→CAA	Mutación K71Q
pPLM21	RnPck1K91Q-F RnPck1K91Q-R	5'-GCCAGGATCGAAAG <u>CC</u> AGACGGTCATCATTAC-3' 5'-GTAATGATGACCGT <u>CT</u> <u>GC</u> TTTCGATCCTGGC-3'	AAG→CAG	Mutación K91Q
pPLM22	RnPck1K124Q-F RnPck1K124Q-R	5'-GTCAGAAGAGGACTTCGAG <u>CA</u> AGCATTCAACGC-3' 5'-GCGTTGAATGCTT <u>G</u> CTCGAAGTCTCTTCTGAC-3'	AAA→CAA	Mutación K124Q
pPLM23	RnPck1K316Q-F RnPck1K316Q-R	5'-GACATTGCCTGGATG <u>CA</u> GTTTGATGCCAAAGGCAAC-3' 5'-GTTGCCTTGGGCATCAA <u>CT</u> <u>CA</u> TCCAGGCAATGTC-3'	AAG→CAG	Mutación K316Q
pPLM24	RnPck1K521Q-F RnPck1K521Q-R	5'-GGTTCGGAAAGAC <u>CA</u> AAAACGGCAAGTTCTCTGG-3' 5'-CCAGAGGA <u>ACT</u> TGCCGTTTTG <u>T</u> CTTTCCGGAACC-3'	AAA→CAA	Mutación K521Q
pPLM25	RnPck1K524Q-F RnPck1K524Q-R	5'-GAAAGACAAAAACGG <u>CC</u> AGTTCTCTGCCCCGATTG-3' 5'-CAAATCCGGGCCAGAGGA <u>ACT</u> <u>GC</u> CGTTTTGTCTTTC-3'	AAG→CAG	Mutación K524Q
pPLM26	RnPck1K594Q-F RnPck1K594Q-R	5'-GTGGAGGAGATCGAC <u>CA</u> AGTATCTGGAGGACCAGGTC-3' 5'-GACCTGGTCTCCAGATA <u>CT</u> <u>GC</u> TCTCTCCAC-3'	AAG→CAG	Mutación K594Q
pPLM28	RnPck1K91AcK-F RnPck1K91AcK-R	5'-GATCGAAAGCTAGACGGTCATCATTACC-3' 5'-CTGGCCACATCCCTGGGG-3'	AAG→TAG	Mutación K91AcK
pPLM29	RnPck1K473AcK-F RnPck1K473AcK-R	5'-GCATAAGGGCTAGGTATCATATGCACG-3' 5'-TCTGCAGCAGCGGTGGCC-3'	AAG→TAG	Mutación K473AcK
pPLM30	RnPck1K521AcK-F RnPck1K521AcK-R	5'-CCGGAAGAG <u>CA</u> TAGAACGGCAAGTTC-3' 5'-AACAGTTGACGTGGAAG-3'	AAA→TAG	Mutación K521AcK
pPLM31	RnPck1K524AcK-F	5'-CAAAAACGG <u>CT</u> AGTTCTCTGGC-3'	AAG→TAG	Mutación K524AcK
	RnPck1K524AcK-R	5'-TCTTCCGGAACAGTTG-3'		
pPLM37	RnPck1S90E-F RnPck1S90E-R	5'-CAGGATCGAA <u>AG</u> TAGACGGTC ATCATTACCCAAGAGC-3' 5'-GCCACATCCCTGGGGTCA-3'	AGC→GAG	Mutación S90E

Tabla 2.12. Relación de oligonucleótidos usados para generar construcciones por mutagénesis dirigida en plásmidos de expresión en células eucariotas. Los nucleótidos modificados por el cebador aparecen subrayados. Los cebadores cuyo nombre incluye la denominación “-F” amplifican la hebra codificante de la construcción mientras que los que contienen la denominación “-R” amplifican la hebra complementaria de la construcción.

Clon	Nombre	Secuencia	Cambio	Objetivo
pCMP4	SsPck1M139L-F	5'-GACCAAATCCACATCTGCGATGGCTCCGAGG-3'	ATG→CTG	Mutación M139L
	SsPck1M139L-R	5'-CCTCGGAGCCATCGCAGATGTGGATTTGGTC-3'		
pCMP6	SsPck1K14A-F	5'-CAACCACTCGGCCGAGTCGTCCGGGGCACCC-3'	AAA→GCA	Mutación K14A
	SsPck1K14A-R	5'-GGGTGCCCCGGACGACTCGGCCGAGTGGTTG-3'		
pCMP7	SsPck1K14A-F	5'-CAACCACTCGGCCGAGTCGTCCGGGGCACCC-3'	AAA→GCA	Mutación K14A
	SsPck1K14A-R	5'-GGGTGCCCCGGACGACTCGGCCGAGTGGTTG-3'		
pCMP17	SsPgc1S430C-F	5'-CAGACTCAGACCAGTGCTACCTGACCGAGACGTC-3'	AGC→TGC	Mutación S430C
	SsPgc1S430C-R	5'-GACGTCTCGGTACGATAGCACTGGTCTGAGTCTG-3'		
pCMP20	SsPgc1-GFP-F	5'-CAGAAGAGGATCTGTTGGATCCACCGGTCCGCCACC-3'	TGA→TGG	Incorporar expresión GFP
	SsPgc1-GFP-R	5'-GGTGGCGACCGGTGGATCCAACAGATCCTCTTCTG-3'		
pCMP21	SsPgc1-GFP-F	5'-CAGAAGAGGATCTGTTGGATCCACCGGTCCGCCACC-3'	TGA→TGG	Incorporar expresión GFP
	SsPgc1-GFP-R	5'-GGTGGCGACCGGTGGATCCAACAGATCCTCTTCTG-3'		
pCMP26 pCMP27	SsMycHis-Pck1-F	5'-CACCACCACGCATCAATGCA GAAGCTGATCTCAGAGGAGG-3'	Inserción	Incorporar cola histidinas
	SsMycHis-Pck1-R	5'-ATGATGATGCATGGTGGGCCCGGGT-3'		
pCMP28	RnPck1S90A-F	5'-CAGGATCGAAGCGAAGACG GTCATCATTACCAAGAGC-3'	AGC→GCG	Mutación S90A
	RnPck1S90A-R	5'-GCCACATCCCTGGGGTCA-3'		
pCPMP29	RnPck1T92A-F	5'-CGAAAGCAAGGCGGTATCATTAC-3'	ACG→GCG	Mutación T92A
	RnPck1T92A-R	5'-ATCCTGGCCACATCCCTG-3'		

Las reacciones de PCR se prepararon como se detalló anteriormente (véase Tabla 2.7) y el programa utilizado fue el siguiente (Tabla 2.13):

Tabla 2.13. Etapas de la reacción de PCR durante la mutagénesis utilizando la polimerasa Pfu Ultra II.			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización	95	120	1
Desnaturalización	95	20	25
Hibridación	60	20	
Extensión	72	240-300*	
Extensión final	72	240-300*	1

* Tiempo de extensión: 240 segundos se utilizaron para la amplificación de plásmidos que incluyeron *Pck1* (1869 bp) y 300 segundos para la amplificación de construcciones que contenían *Pgc1α* (2391 bp).

Tras la amplificación, se tomó una alícuota de 5 μL y se comprobó la correcta amplificación en un gel de agarosa al 1%. La DpnI es una nucleasa que reconoce DNA metilado y lo digiere. A diferencia del DNA amplificado durante la PCR, el DNA molde purificado de bacterias está metilado. Por tanto, el DNA molde se eliminó utilizando DpnI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). La reacción se llevó a cabo sobre los 45 μL restantes del producto de PCR a los cuales se les añadió 5 μL de tampón para DpnI y 2 unidades de enzima. Se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas y posteriormente se inactivó DpnI incubando a 80°C durante 20 minutos. 10 μL de esta mezcla se usaron para transformar *E. coli DH5 α* , como se describió en 2.6.4.4. El DNA de las colonias seleccionadas se purificó y se secuenció como se describió en 2.6.4.5.

Los cebadores para los clones pPLM28-31 se generaron con NEBaseChanger® (<http://nebasechanger.neb.com/>). A diferencia de otros sistemas de mutagénesis dirigida, este sistema utiliza cebadores no solapantes para la amplificación de la construcción. Para elaborar los mutantes se utilizó Q5® Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). Las reacciones de PCR se prepararon del siguiente modo (Tabla 2.14).

Tabla 2.14. Componentes de la reacción de PCR para las mutagénesis utilizando la polimerasa Q5.	
Reactivo	Volumen (μL)
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5
Cebador F (sentido 5' a 3') (10 μM)	1.25
Cebador R (antisentido, 3' a 5') (10 μM)	1.25
DNA del inserto purificado (10 ng/ μL)	1
H ₂ O	9
Volumen total	25

El programa de tiempos y temperaturas que se siguió durante estas reacciones se detalla en la Tabla 2.15:

Tabla 2.15. Etapas de la reacción de PCR durante la mutagénesis utilizando la polimerasa Q5.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Desnaturalización	98	30	1
Desnaturalización	98	10	25
Hibridación	60	20	
Extensión	72	240	
Extensión final	72	240	1

Tras la PCR, se comprobó la amplificación de las construcciones mediante electroforesis en geles de agarosa. El DNA molde se digirió usando KLD enzyme mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU). Esta mezcla de enzimas incluye una kinasa que incorpora grupos fosfato a los extremos del DNA amplificado, una ligasa que une dichos extremos y DpnI que digiere el DNA metilado. 1 µL del producto de PCR se mezcló con 5 µL de 2x KLD buffer, 1 µL de mezcla de enzimas KLD (10x) y agua destilada hasta un volumen de 10 µL. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. 5 µL de esta mezcla se utilizaron para transformar *E. coli* DH5α como se describió en 2.6.4.4. y las construcciones mutadas se analizaron como en 2.6.4.5.

2.6.4.7. Otras construcciones

En este trabajo se utilizaron otras construcciones compradas o cedidas por otros laboratorios que se resumen en la Tabla 2.16:

Tabla 2.16. Relación de construcciones utilizadas en este trabajo compradas o cedidas. Los clones denominados como pCMP se utilizaron para la expresión en eucariotas y los denominados como pPLM para la expresión en procariontes.

Clon	Proteína codificada	Especie	Origen	Etiqueta
pCMP8	O-GlcNAc transferasa (O-GT)	Humano	GenScript (OHu54262)	N-Flag
pCMP13	p300	Humano	Dra. S. Llanos (CNIO, Madrid, España)	C-HA
pCMP24	SIRT1 (aas 86-747)	Humano	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	N-Flag
pCMP25	SIRT1 p.H363Y (aas 86-747)	Humano	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	N-Flag
pPLM32	ULP1	<i>S. cerevisiae</i>	Dr. Ramón Hurtado (BIFI, UZ, España)	N-His
pPLM33	SIRT1 (aas 86-747)	Humano	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	N-His
pPLM34	SIRT2	Humano	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	N-His
pPLM35	Acetil-lisina-tRNA sintetasa	<i>M. barkeri</i>	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	-
pPLM36	Complejo TIP60	Humano	Dr. John Denu (WID, Madison, WI, EEUU)	N-His
pCMP28	GSK3β	Humano	Addgene #16260	C-Myc

2.7. Expresión y purificación de proteínas producidas en *E. coli*

La expresión de proteínas en procariontes se llevó a cabo utilizando distintas cepas de *E. coli* de acuerdo a las necesidades experimentales. Por un lado, se utilizó *E. coli* BL21 DE3 Star. Esta cepa es lisogénica para el fago λ que expresa DE3 que porta el gen de la mRNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac*. El IPTG es capaz de activar el promotor y favorecer la síntesis de mRNA de la proteína heteróloga o recombinante que se quiera expresar. Además, esta cepa presenta niveles más bajos de RNasa y proteasas, lo que favorece la estabilidad del mRNA y evita la degradación de proteínas recombinantes. Por otro lado, en determinados experimentos se utilizó la cepa *E. coli* BL21 DE3 Δ CobB, con las mismas características que la anterior, pero con la salvedad de que la expresión del gen que codifica la deacetilasa CobB estaba anulada. También se utilizó la cepa *E. coli* BL21 DE3 pLysS que sobreexpresa pequeñas cantidades de lisozima que reduce la expresión de genes recombinantes que en grandes cantidades pueden resultar tóxicos para la célula. En general, se utilizó la cepa *E. coli* BL21 DE3 Star salvo que se indique lo contrario.

2.7.1. Transformación y pruebas de expresión a pequeña escala

En primer lugar, las cepas químicamente competentes de *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* BL21 DE3 pLysS se transformaron como se detalló en el apartado 2.6.4.4.

La cepa *E. coli* BL21 DE3 Δ CobB se utilizó para la expresión de proteína que presentó acetil-lisinas incorporadas en sitios específicos. Esta cepa fue desarrollada en la Universidad de Wisconsin-Madison y usada en un trabajo anterior (Baeza et al., 2014). Para ello, se co-transformó con cada una de las construcciones pPLM27-31 la construcción pPLM35 (pBK-Acetil-lisina-tRNA^{CUA}-sintetasa) por medio de electroporación, utilizando células electrocompetentes. La acetil-lisina-tRNA^{CUA}-sintetasa es una proteína modificada procedente de *Methanosarcina barkeri* que es capaz de incorporar una acetil-lisina cuando en el mRNA aparece el codón UAG. Este codón indicaría terminación de la traducción del mRNA, pero se ha visto que en este

tipo de bacterias es capaz de codificar aminoácidos especiales como la pirrolisina. Por ello, a todos los plásmidos pPLM28-31 se les incluyó por mutagénesis el codón TAG, que se transcribe a UAG y en presencia de la acetil-lisina-tRNA^{CUA}-sintetasa incorpora lisinas acetiladas de manera totalmente específica y homogénea, generando así las variantes K-AcK. Además, la neutralización de la deacetilasa CobB evita la deacetilación durante el proceso de producción. La transformación utilizando células electrocompetentes se realizó del siguiente modo:

- Se tomaron 30 μ L de células electrocompetentes, descongeladas previamente sobre hielo, y se mezclaron con 100 ng de cada una de las construcciones a co-transformar.
- En una cubeta de electroporación se añadió la mezcla de células y DNA y se electroporaron inmediatamente en un electroporador MicroPulser (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) utilizando 2.1 kV, 100 Ω , 25 μ F y 2.6 ms.
- Se añadió medio LB hasta un volumen de 1 mL y se recuperaron las células en un tubo de 1.5 mL durante 1 hora a 37°C y 200 rpm.
- 100 μ L de estas células se sembraron en placas de LB agar suplementadas con kanamicina y estreptomycinina y se incubaron a 37°C una noche.

Se realizaron pruebas de expresión de todas las construcciones antes de llevar a cabo experimentos a gran escala. Para ello, se seleccionaron colonias de cada una de las placas y se crecieron en 5 mL de medio líquido 2xYT, suplementado con el correspondiente antibiótico, una noche a 37°C y 200 rpm en un agitador orbital. 0.2 mL de esas células se vertieron sobre otros 5 mL de medio con antibiótico. Las células se siguieron incubando hasta alcanzar una $OD_{600} \sim 0.5$ y se indujeron las de un tubo añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM, dejando las otras sin inducir, como control negativo de expresión. Las células se incubaron a 37°C durante 3 horas más. Se tomaron 100 μ L de cada tubo y se mezclaron con el mismo volumen de tampón de carga para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se hirvieron a 100°C

durante 10 minutos y se separaron en un gel de poliacrilamida. Las colonias positivas se conservaron como “stock” de glicerol (2.6.4.5).

2.7.2. Expresión y purificación de Pck1 porcina y del híbrido Pck1 cerdo-rata

La expresión y purificación de las distintas proteínas se llevó a cabo en las etapas que se detallan a continuación. Cualquier modificación respecto a este protocolo será señalada para cada caso concreto.

2.7.2.1. Crecimiento bacteriano

El proceso comenzó con el crecimiento de bacterias en 50 mL de precultivo (medio 2xYT suplementado con el/los antibiótico/s correspondiente/s a la concentración adecuada) a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar la fase estacionaria. El precultivo se añadió a un cultivo de 2 L del mismo medio. Cuando la OD₆₀₀ alcanzó un valor aproximado de 0.5 el cultivo se enfrió en hielo a 4°C durante 20 minutos y se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM. Se continuó la incubación a 18°C y 180 rpm durante toda la noche. Los 2 L de medio se centrifugaron a 6500 g a 4°C durante 15 minutos, descartándose el sobrenadante. El pellet se congeló en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C.

2.7.2.2. Lisis bacteriana

El pellet se resuspendió en tampón A (25 mM HEPES, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol y 2 mM β-mercaptoetanol). El tampón se suplementó con inhibidores de proteasas: 1 mM PMSF, 10 μM benzamidina y 0.5 mM leupeptina. Además, se añadió 1 mg de lisozima. Se añadió solución de lisis en una relación 1:5 pellet-tampón (g/mL). Las bacterias se lisaron con un sonicador Vibra-Cell (Sonics & Materials, Newtown, CT, EEUU) mediante 10 ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno con un descanso de 30 segundos entre ciclos a una amplitud del 80% de la máxima del aparato. La lisis se llevó a cabo en hielo. El lisado celular se centrifugó a 40000 g en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J26XP (Beckman Coulter, Pasadena, CA, EEUU) durante 20 minutos a 4°C, tras lo cual se descartó el pellet. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0.45 μm.

2.7.2.3. Cromatografía de afinidad

Como se detalló anteriormente, la Pck1 se expresó con una cola de histidinas en el extremo amino terminal. Debido a la afinidad de esta cola por ciertos metales como níquel o cobalto, se puede purificar proteína utilizando columnas de afinidad de Ni²⁺- o Co²⁺-NTA. La purificación de Pck1 a partir del sobrenadante obtenido en el punto anterior se llevó a cabo en una columna de cobalto-NTA HiTrap Talon de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU) a 4°C. La columna se adaptó a un equipo de purificación Äkta Purifier 10 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU) y se equilibró con tampón A. Tras la carga e inyección de la muestra, la columna se lavó con tampón A hasta que la Abs₂₈₀ descendió a la línea base. La proteína se eluyó con tampón B (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol y 2 mM β-mercaptoetanol) en un volumen total de 20 mL. Una alícuota de la proteína resultante se analizó por SDS-PAGE para determinar su nivel de pureza. Finalmente, la proteína se dializó en tampón C (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP) en un tubo concentrador Amicon® Ultra Centrifugal Filter 30 kDa (Millipore, Tullagreen, Irlanda). Se determinó la concentración de proteína por el método Bradford, se prepararon alícuotas a 3 mg/mL, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. Estas alícuotas se usaron para la determinación de las constantes cinéticas.

2.7.2.4. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

Para estudios biofísicos como dicroísmo circular o cristalización, detallados más adelante, el proceso de purificación continuó. La construcción presentaba un sitio de corte reconocible por la PreScission Protease (cedida por el Dr. Ramón Hurtado-Guerrero y purificada por Sonia Vega, BIFI, Universidad de Zaragoza, España) (véase Esquema 2.1). La Pck1 se incubó con dicha proteasa en una relación 50:1, Pck1:Proteasa (mg/mg) una noche a 4°C. La proteína se cargó de nuevo en una columna de níquel-NTA HisTrap Crude FF de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU) equilibrada en tampón D (25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT). Al haber separado la cola de histidinas de la Pck1, la proteína no se unió a la matriz de la columna y se recogió en

el tampón D. La proteína se concentró mediante un centrífugo hasta un volumen de 2 mL y se inyectó en una columna de exclusión molecular HiLoad 26/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU) equilibrada en tampón E (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT). Se recogieron fracciones de 3 mL y se analizaron por SDS-PAGE. Aquellas fracciones más puras se concentraron, se dializaron en tampón D y se cuantificaron por absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $105880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo que equivale a un factor de 1.537 g/L, calculado por ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). En todas las etapas se utilizó SDS-PAGE para determinar la pureza y la presencia de proteína.

2.7.3. Expresión y purificación de Pck1 de rata

El protocolo que se siguió para la expresión, lisis y purificación en columna de afinidad fue el mismo que el descrito en el apartado 2.7.2 con las siguientes modificaciones.

2.7.3.1. Expresión y purificación de Pck1 y los mutantes K-Q

Como se ha descrito anteriormente (véase 2.6.2), la construcción pPLM7 y clones derivados de este expresan una proteína de fusión SUMO-Pck1 que puede ser digerida con la proteasa ULP1. Entonces, tras la purificación en columna de afinidad de cobalto-NTA, el complejo se digirió con ULP1 en una proporción 1:50 (ULP1:Pck1) (mg/mg). La digestión se llevó a cabo a 4°C una noche quedando por un lado SUMO con la cola de histidinas y por otro Pck1. Tras la digestión se inyectó la proteína en una columna de níquel-NTA y se recogió en el mismo tampón D. La Pck1 se concentró hasta 3 mg/mL y se cuantificó por absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $108860 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo que equivale a un factor de 1.568 g/L, calculado por ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Esta proteína se utilizó para estudios de cinética. Para estudios de cristalografía la proteína se inyectó en una columna aniónica Q FF de 5 mL (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EEUU) equilibrada en tampón D. La Pck1 se eluyó en tampón F (igual al tampón D, pero con 500 mM NaCl). La proteína se

dializó en tampón D, se concentró y se cuantificó como se ha descrito en el apartado anterior.

2.7.3.2. Expresión y purificación de Pck1 y las variantes K-AcK

Las construcciones pPLM27-31 se expresaron en *E. coli* BL21 DE3 Δ CobB. Estas células se llevaron a una $OD_{600} \sim 0.4$ tras lo cual se añadió N ϵ -acetil-L-lisina (Chem-Impex International, Wood Dale, IL, EEUU) hasta una concentración final de 10 mM, con ello la acetil-lisina-tRNA sintetasa tiene el sustrato necesario para incorporación de acetil-lisinas en los sitios específicos. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de la inducción con IPTG. La purificación en columna de afinidad se llevó a cabo del mismo modo que en el caso de pPLM7, digiriendo luego con la PreScission Protease como se ha descrito en 2.7.2. Posteriormente, se utilizó una columna de níquel-NTA para separar la cola de histidinas de la solución con Pck1. Finalmente, se utilizó una columna aniónica como se ha explicado anteriormente, Pck1 se concentró y se cuantificó. Esta proteína se utilizó para estudios de cinética y para cristalización. En todas las etapas se siguió la proteína por SDS-PAGE.

2.7.4. Expresión y purificación de ULP1

La expresión y purificación se llevó a cabo como se ha mencionado en 2.7.2. Las células se lisaron en tampón 20 mM HEPES, pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoetanol y 10 mM imidazol suplementado con lisozima e inhibidores de proteasas. La purificación se llevó a cabo en columna de níquel-NTA, equilibrada en ese mismo tampón. La elución se hizo en el tampón 20 mM HEPES, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM β -mercaptoetanol y 500 mM imidazol. Se comprobó la presencia de ULP1 por SDS-PAGE. La proteína se dializó en tampón 20 mM HEPES, pH 8.0, 150 mM NaCl y 2 mM β -mercaptoetanol a 4°C una noche, se cuantificó por el método Bradford, se preparó en alícuotas de 1 mg/mL con 50% glicerol y se almacenó a -80°C.

2.7.5. Expresión y purificación de SIRT1 y SIRT2

Se expresaron los clones pPLM33 y pPLM34 (véase Tabla 2.16) en *E. coli* BL21 DE3 Star (véase 2.7.1). El protocolo de expresión fue idéntico al mencionado anteriormente. La lisis y purificación se llevó a cabo en las mismas condiciones citadas el apartado anterior. Tras la purificación se comprobó la pureza por SDS-PAGE, las proteínas se dializaron en tampón Tris-HCl, pH 7.5, 10% glicerol, 1 mM DTT a 4°C, se concentraron, se cuantificaron por el método Bradford y se conservaron a -80°C.

2.7.6. Expresión y purificación del complejo TIP60

El complejo TIP60 está formado por un conjunto de tres proteínas, TIP60b, ING3 (del inglés, Inhibition of Growth protein 3; aas 1-300) y EPL1 (del inglés, Enhancer of polcomb-like protein 1; aas 1-400) que se expresaron en conjunto, con esta última marcada con cola de histidinas en un plásmido policistrónico pST44 desarrollado en otro laboratorio (Selleck and Tan, 2008). El complejo, codificado por el clon pPLM36 (véase Tabla 2.16), se expresó en *E. coli* BL21 DE3 pLysS. El control de expresión de proteínas recombinantes característico de esta cepa fue necesario para evitar la toxicidad asociada a la hiperacetilación. Las células se indujeron con 0.4 mM IPTG al alcanzar una $OD_{600} \sim 0.5$, se incubaron una noche a 18°C en un agitador orbital a 180 rpm y se recogieron por centrifugación como se ha descrito en 2.7.2.1. La purificación se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Arnold et al., 2011). Las células se lisaron en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol y 10% glicerol suplementado con 1 mM benzamidina. Tras centrifugar, el clarificado se inyectó en una columna de níquel-NTA equilibrada en el mismo tampón y se eluyó en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol y 500 mM imidazol, utilizando un gradiente de 0 a 500 mM imidazol durante 20 minutos a un flujo de 5 mL/min. Se analizó la proteína por SDS-PAGE y las fracciones más puras se dializaron en 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoetanol y 10% glicerol a 4°C utilizando SnakeSkin™ Dialysis Tubing 10 kDa MWCO (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, EEUU). La proteína se concentró y se cuantificó por el método Bradford. Se conservó a -80 °C.

2.8. Expresión y purificación de Pck1 en células HEK293T

Las HEK293T son una línea celular inmortalizada cuyo origen son células embrionarias de riñón modificadas. Una de las características de mayor interés es la facilidad de estas células para ser transfectadas, es decir, incorporar DNA exógeno en su interior del mismo modo que la transformación en *E. coli* pero, en este caso, la mayoría de veces, de manera transitoria, puesto que los plásmidos utilizados no suelen llevar un origen de replicación eucariota ni se suele usar selección con antibióticos, excepto para determinadas aplicaciones, por lo que el plásmido se va perdiendo a medida que las células se dividen. Dado que la acetilación de Pck1 es dependiente de la concentración de glucosa en el medio, se purificó dicha proteína de células HEK293T transfectadas e incubadas a diferentes concentraciones de glucosa.

2.8.1. Cultivo y transfección

Las células HEK293T se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) en placas de 150 mm de diámetro en un incubador en condiciones estándar (37°C, 5% CO₂ y atmósfera humidificada). Tras alcanzar la confluencia, 1/3 de las células se sembró de nuevo en una placa de 150 mm. Las células se incubaron una noche en estas condiciones. Al día siguiente las células al 40-60% de confluencia se transfectaron utilizando el sistema Profection Mammalian Transfection System (Promega, Madison, WI, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema utiliza la precipitación del DNA con CaCl₂ para la transfección de células. Se usaron 15 µg de la construcción pCMP23 (véase Tabla 2.5) por placa y un total de 6 placas. Tras la transfección, las células se incubaron 24 horas más en el incubador. Transcurrido ese tiempo, el medio fue reemplazado por DMEM con distintas concentraciones de glucosa (2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 mM, una condición por placa) sin FBS y se incubaron las células 24 horas más. Cuando se especifique, se añadió al medio el inhibidor de p300, C646 (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, EE.UU.), a una concentración final de 10 μ M. Este mismo procedimiento se siguió cuando en el experimento se co-transfectaron las construcciones pCMP23 y pCMP13 (véase Tabla 2.16).

De un modo semejante, la expresión de las construcciones pCMP26 y pCMP27 (véase Tabla 2.10), que codifican la Pck1 porcina, se llevó a cabo del mismo modo, pero las células se crecieron en 6 frascos de 75 cm² para cada condición y proteína (salvaje o variante). Para ambas proteínas, se trabajó con dos condiciones, baja glucosa (2.5 mM) y alta glucosa (2.5 mM), tanto para expresar Pck1 como Pck1 p.M139L. La purificación de proteína a partir de cada condición se llevó a cabo a partir de $\sim 1 \times 10^8$ células.

2.8.2. Purificación

La construcción pCMP23 codifica una cola de histidinas en el extremo C-terminal que permite la purificación utilizando resina de níquel. Las células se lavaron dos veces en PBS frío, se recogieron en ese mismo tampón y se centrifugaron a 500 g en tubos de 15 mL a 4°C. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 0.8 mL de tampón A (véase 2.7.2.2) suplementado con inhibidores de deacetilasas (1 mM NAM, 1 mM butirato de sodio) e inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 mM aprotinina y 0.5 mM leupeptina). Las células se lisaron en un homogeneizador Dounce de 1 mL. Los lisados se centrifugaron a 14000 g y 4°C y el sobrenadante se añadió a 500 μ L de resina de cobalto-agarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU). Después de 2 horas de incubación en rotación, la resina se centrifugó a 500 g y 4°C, descartando el sobrenadante. La resina se lavó añadiendo 1 mL de tampón A y se incubó durante 10 minutos en rotación. La resina se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados más con tampón A y luego otros dos lavados con el mismo tampón A suplementado con imidazol hasta una concentración final de 50 mM y finalmente se eluyó Pck1 en 1 mL de tampón B (véase 2.7.2.3). La pureza de la Pck1 se analizó por SDS-PAGE. La Pck1 se dializó en tampón C (véase 2.7.2.3) y se cuantificó como se ha descrito

anteriormente (véase 2.7.2.4). Esta proteína se utilizó para ensayos enzimáticos y para el análisis de los sitios de acetilación por espectrometría de masas.

La purificación de las isoformas porcinas Pck1 y Pck1 p.M139L se realizó del mismo modo, pero utilizando una columna de Hitrap TALON (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU) de 1 mL.

2.9. Ensayos enzimáticos

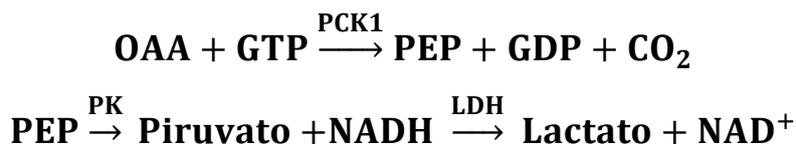
2.9.1. Ensayos para la determinación de las propiedades cinéticas de Pck1

La Pck1 es una enzima que cataliza la reacción reversible que forma fosfoenolpiruvato (PEP) a partir de ácido oxalacético (OAA) (véase Reacción 1.1, página 28) en el citosol.

Los ensayos realizados se llevaron a cabo en placas de plástico transparente y fondo plano de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ L, a 30°C, determinando la oxidación del NADH a NAD⁺ por absorbancia a 340 nm en continuo y utilizando un lector de placas Synergy H4 (Biotek, Winooski, VT, EEUU). En todos los casos se utilizaron ensayos acoplados. Las condiciones fueron las mismas tanto para la Pck1 de cerdo como la de rata. Los reactivos GDP, GTP, ADP, NADH y DTT así como las enzimas malato deshidrogenasa (MDH), la mezcla de piruvato kinasa/lactato deshidrogenasa (PK/LDH) y lactato deshidrogenasa fueron de Sigma (St. Louis, MO, EEUU). El PEP fue de Bachem (Torrance, CA, EEUU). El KHCO₃, MnCl₂ y MgCl₂ fueron de Panreac (Barcelona, España). Para la determinación de las constantes cinéticas se varió la concentración del correspondiente sustrato en la mezcla de reacción.

2.9.1.1. Ensayo en el sentido de OAA a PEP

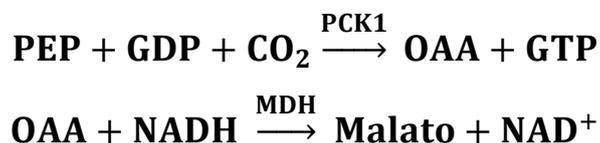
Las condiciones del ensayo fueron 100 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.2 mM MnCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM ADP (sustrato de PK), 1 mM GTP, 0.4 mM NADH, 0.5 unidades de cada enzima acoplada PK/LDH, 400 μM OAA y 0.1 μg de Pck1. La reacción se comenzó añadiendo OAA a la mezcla, después de añadir Pck1. El Esquema 2.3 muestra las etapas de esta reacción.



Esquema 2.3. Representación del ensayo enzimático en sentido de OAA a PEP para Pck1.

2.9.1.2. Ensayo en el sentido de PEP a OAA

La reacción se llevó a cabo en 100 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.2 mM MnCl₂, 8 mM MgCl₂, 2 mM PEP, 2 mM GDP, 0.4 mM NADH, 0.25 unidades de MDH y 0.2 μg de Pck1. La reacción se comenzó añadiendo Pck1 a la mezcla. El Esquema 2.4 muestra esta reacción.

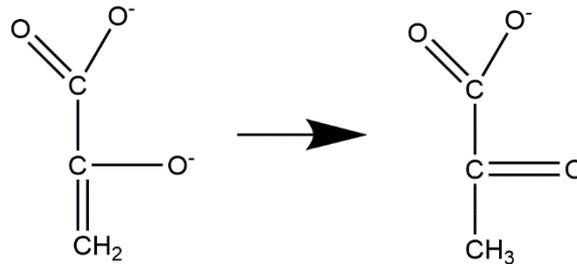


Esquema 2.4. Representación del ensayo enzimático en sentido de PEP a OAA para Pck1.

2.9.1.3. Determinación de la actividad piruvato kinasa (PK).

Se ha descrito que la Pck1 es capaz de realizar actividad PK (Johnson et al., 2016). Durante la descarboxilación del OAA se forma un metabolito intermediario, el enolato. La protonación de este enolato da lugar a piruvato (Esquema 2.5). En esta reacción de

tautomerización ceto-enólica, el equilibrio aparece desplazado hacia la forma ceto, en este caso piruvato (Vollhardt and Schore, 2008).



Esquema 2.5. Transición de enolato a piruvato. Como puede apreciarse en el esquema la protonación del enolato (izquierda) da lugar a piruvato (derecha).

La actividad PK es 100 veces menor que la gluconeogénica (OAA→PEP) en la Pck1 salvaje, pero se ha descrito en varios trabajos (Johnson and Holyoak, 2010, 2012; Johnson et al., 2016). La mezcla de la reacción consistió en los mismos componentes de la reacción de OAA a PEP (véase 2.9.1.1) con la salvedad que el ADP, sustrato de la PK, no se añadió y la mezcla de enzimas PK/LDH fue sustituida por 0.8 unidades de LDH. La reacción comenzó añadiendo OAA una vez añadida Pck1. Se utilizaron entre 1 y 3.5 μg de Pck1 por ensayo.

2.9.1.4. Determinación de la capacidad de Pck1 de retención del intermediario enolato

La integridad del intermediario enolato está determinada por la capacidad de la enzima de proteger y mantener cerrado el sitio activo. Por ello, se determinó la capacidad de retener este intermediario por medio de una semi-reacción. A la reacción del apartado 2.9.1.3., se le sustituyó el GTP por GDP. De acuerdo a la reacción catalizada por Pck1 (véase Reacción 1.1, página 28), la formación de PEP exige OAA y GTP. Entonces, la sustitución de GTP por GDP bloquea la reacción, no es posible transferir el fosfato β del GDP al OAA y, por tanto, el enolato formado no llega a formar PEP, se protona espontáneamente y forma piruvato. La eficacia de esta reacción será entonces mayor

en aquellas situaciones que hagan que la Pck1 tenga dificultades para mantener el estado cerrado durante la catálisis.

2.9.2. Ensayos de actividad acetil-transferasa del complejo TIP60

Se ha observado en *S. cerevisiae* que el silenciamiento de la acetil-transferasa TIP60 disminuye los niveles de acetilación de Pck1p (Lin et al., 2009). Por ello se decidió comprobar *in vitro* si este proceso era directo. En el ensayo, Pck1 e histona H4 se usaron como sustratos del complejo TIP60. La histona H4 de *Xenopus laevis* (cedida por la Dra. Jin-Hee Lee, Wisconsin Institutes for Discovery, Madison, EEUU) es un sustrato conocido del complejo TIP60 y se utilizó como control positivo. La reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L compuesto por 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.2 mM EDTA, 1 mM acetil-CoA, Pck1 o H4 (7 μ M) y 1 μ M complejo TIP60. La reacción se llevó a cabo en un bloque termostaticado a 30°C durante una hora o toda la noche. Como controles se utilizaron Pck1 o H4 solos, en presencia única de acetil-CoA o únicamente con el complejo TIP60. El producto de la reacción se detectó por western blot, que se explicará más adelante.

2.9.3. Ensayos de actividad deacetilasa de SIRT1 y SIRT2

Se ha señalado que las deacetilasas (o sus homólogos en humanos) SIRT1 (Lin et al., 2009) y SIRT2 (Jiang et al., 2011) deacetilan Pck1. Se decidió estudiar la capacidad de estas deacetilasas de deacetilar Pck1 tanto en las muestras procedentes de HEK293T (véase 2.8) como en aquellas obtenidas en *E. coli* BL21 DE3 Δ CobB (véase 2.7.3.2). A continuación, se detallan dichos experimentos.

2.9.3.1. Deacetilación de muestras procedentes de HEK293T y variante Pck1 p.S90E+K91AcK

La reacción consistió en 20 mM tampón fosfato sódico, pH 7.5, 1.4 μ M Pck1, SIRT1 o SIRT2 recombinantes a una concentración final de 0.7 μ M y 0.5 mM NAD⁺. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ L durante 30 minutos a 30°C. Pck1 se diluyó

10 veces en tampón 25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT y su actividad se determinó en ambos sentidos de la reacción (véanse 2.9.1.1 y 2.9.1.2). La reacción de deacetilación se determinó también por western blot utilizando 1 µg de proteína. Para los estudios de espectrometría de masas se utilizaron 2 µg de proteína. En todos los casos se utilizó como control Pck1 en presencia de NAD⁺ y Pck1 en la sola presencia de la correspondiente sirtuina. La variante Pck1 S90E+K91AcK se deacetiló en las mismas condiciones en un tiempo de 2 horas o durante toda la noche, según se especifique más adelante en el texto.

2.9.3.2. Deacetilación de la variante Pck1 K91AcK

El procedimiento fue idéntico al del punto 2.9.3.1 salvo que la ratio molar sirtuina:Pck1 fue de 1:4, utilizando una concentración de Pck1 de 0.7 µM, 2 mM NAD⁺ y un tiempo de incubación de 2 horas. La detección de la deacetilación se llevó a cabo por western blot y la actividad Pck1 se determinó en ambos sentidos de la reacción como se describió en 2.9.1.1 y 2.9.1.2.

2.9.4. Ensayos de actividad GSK3β

La Pck1 recombinante (1.4 µM) se incubó a 37°C en presencia de GSK3β recombinante (0.35 µM) en tampón 25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT, 2 mM ATP y 10 mM MgCl₂ durante 2 horas. La fosforilación fue analizada por western blot.

2.10. Caracterización de las propiedades biofísicas y de sensibilidad a proteasas de Pck1

A lo largo de este trabajo se realizaron distintos experimentos con el fin de caracterizar las propiedades biofísicas de la Pck1 y sus diferentes variantes.

2.10.1. Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular es una técnica que permite determinar la estructura secundaria de proteínas, así como sus propiedades de plegamiento. Esta técnica se basa en la capacidad de absorción de la luz circularmente polarizada de las moléculas en solución (Greenfield, 1999). El estudio del espectro ultravioleta lejano (190-250 nm) permite examinar la estructura secundaria (hélices alfa, láminas beta, giros beta y regiones desordenadas). Con fines comparativos se decidió analizar por esta técnica las enzimas porcinas Pck1 salvaje y p.M139L obtenidas en el punto 2.7.2.4. Para ello se utilizó un equipo Chirascan (Applied Photophysics, Surrey, Reino Unido). La proteína purificada se preparó en tampón 25 mM HEPES, pH 7.5, y 10 mM DTT a una concentración de 20 μ M. Las lecturas se llevaron en una cubeta de 0.1 mm y 25° C en un rango de longitudes de onda de 190 a 250 nm. La elipticidad molar fue representada en $m\theta \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a partir de los datos obtenidos y utilizando la siguiente formula:

$$[\theta] = \frac{\theta}{c \times l \times 10 \times N}$$

Donde θ es el grado de elipticidad molar, c la concentración de la muestra (M), l el paso de luz de la cubeta (mm) y N el número de residuos de la proteína. 10 es un factor que convierte el paso de luz, l , a centímetros.

2.10.2. Cristalización

Estos experimentos se llevaron a cabo con la ayuda del Dr. Ramón Hurtado (BIFI, Zaragoza, España). La cristalización es un proceso por el que las proteínas forman cristales bajo determinadas condiciones a una determinada concentración. Este proceso es totalmente empírico y las condiciones bajo las cuales cada proteína cristaliza dependen de la propia proteína. La cristalización permite obtener la estructura tridimensional de proteínas. Se decidió cristalizar, entonces, Pck1 salvaje y la variante p.M139L obtenidos en el punto 2.7.2.4. La Pck1 se preparó a una concentración de 8 mg/mL sola o en presencia del complejo de ligandos PEP-GDP -Mn²⁺ (5, 5 y 2 mM,

respectivamente) o el complejo OAA-GTP-Mn²⁺ (2.5, 2.5 y 2 mM, respectivamente). Se utilizaron las condiciones de los siguientes “kits” de cristalización: JCSG, PEG-Salt, Basic, Classic de Jena Bioscience (Jena, Alemania) y los “kits” ProPlex y Ammonium Sulphate de Molecular Dimensions (Altamonte Springs, FL, EEUU). 0.5 µL de solución se mezclaron con 0.5 µL de proteína. Las placas se incubaron a 18°C en el incubador de placas Formulatrix (Bedford, MA, EEUU). Se probaron un total de 576 condiciones.

La primera aproximación para la cristalización de Pck1 salvaje y variante K91AcK de rata obtenidos en el punto 2.7.3.2 se llevó a cabo en JCSG y PEG-Salt. La Pck1 se preparó a una concentración de 10 mg/mL sola o en presencia del complejo de ligandos PEP-GDP-Mn²⁺ (5, 5 y 2 mM, respectivamente) o el complejo oxalato-GTP-Mn²⁺ (2.5, 2.5 y 2 mM, respectivamente). Se obtuvieron cristales en diversas condiciones que se mejoraron modificando la concentración de PEG y el pH. De estas mejoras, la condición 100 mM HEPES, pH 8, 24% PEG 3350 y 200 mM formato de magnesio mejoró con aditivos. Finalmente, los cristales del enzima salvaje y de K91AcK se crecieron en placas de 24 pocillos por el método de gota colgante a 20°C mezclando 2 µL de la solución de proteína con 2 µL de solución de cristalización y 1 µL de 0.5 M NaF. Algunos cristales se incubaron en presencia de los mismos ligandos durante 6 horas (método conocido como “soaking”) antes de congelarlos en 100 mM HEPES, pH 8, 24% PEG 3350, 200 mM formato de magnesio y 20% etilenglicol. Los cristales se enviaron al sincrotrón ALBA (Campus Bellaterra, Barcelona, España) y se difractaron. La resolución de estructuras se llevó a cabo utilizando las aplicaciones de CCP4 (Winn et al., 2011), Scala, Molrep y Refmac 5.

2.10.3. Determinación de la resistencia térmica

Esta parte del trabajo la realizó Jorge Hidalgo (Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España). La determinación de los valores D_t de las enzimas es útil para comprobar la resistencia a la temperatura. Los valores D_t indican el tiempo que una enzima tarda en reducir un 90% su actividad inicial. Por ello se incubaron 20 µL de la Pck1 porcina salvaje y p.M139L (1 mg/mL) en capilares independientes de 100 µL a 50°C

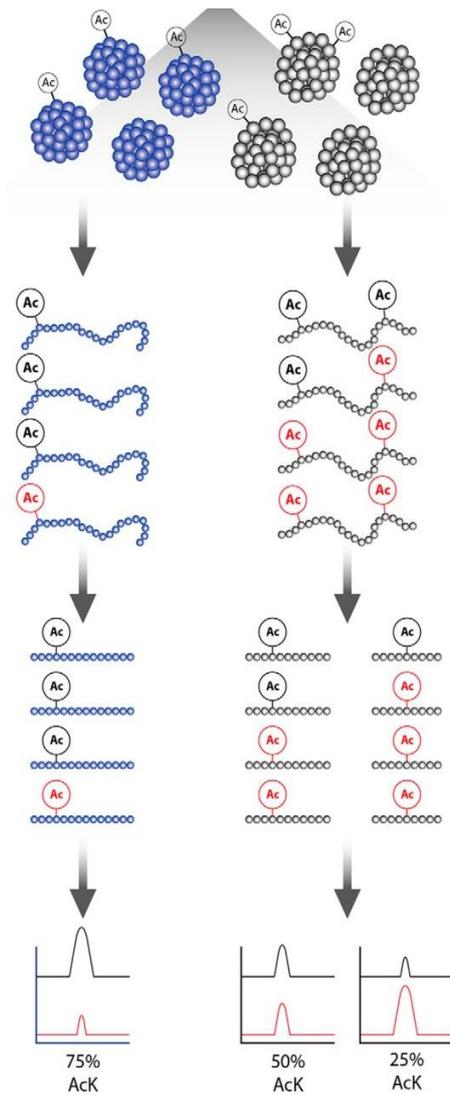
sola o en la presencia individual de sustratos OAA, GTP, PEP o GDP (1 mM). Se incubaron los capilares a distintos tiempos e inmediatamente se introdujeron en agua con hielo. La actividad se determinó en uno de los sentidos de la reacción (véase 2.9.1.2). Los valores el logaritmo de la actividad se representaron frente al tiempo y se obtuvo una recta de regresión que permitió obtener el valor D_t .

2.10.4. Determinación de la sensibilidad a proteasas

La sensibilidad a proteasas es una forma indirecta de detectar cambios en la estructura cuando se quiere comparar variantes. Por ello, se trataron Pck1 salvaje y p.M139L (1 mg/mL) de cerdo en presencia de tripsina (0.2 μ g totales) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) o proteinasa K (0.4 μ g totales) (Durviz, Paterna, España). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ L en un baño termostaticado a 37°C. La incubación se llevó a cabo a distintos tiempos, tras los cuales las muestras se hirvieron inmediatamente en tampón de carga durante 5 minutos y se resolvieron por SDS-PAGE.

2.11. Preparación de péptidos y análisis por LC-MS/MS

La técnica de espectrometría de masas utilizada combina las propiedades de los péptidos de ser eluidos tras su paso por una cromatografía líquida (LC) y sus propiedades volátiles una vez ionizados en un campo eléctrico utilizando dos analizadores (MS/MS) en un único equipo de espectrometría de masas. Con ello se aumenta la sensibilidad de la técnica. Conocidas las enzimas que han digerido la proteína de interés y los péptidos resultantes, se contrastan los datos obtenidos durante el experimento de LC-MS/MS para identificar la masa de estos péptidos. Una modificación de este protocolo permite cuantificar el porcentaje de una población del mismo péptido que se encuentra acetilada. Dado que la Pck1 se acetila se decidió conocer qué sitios presentaban mayores porcentajes de esta modificación. El protocolo que se siguió se ha descrito previamente (Baeza et al., 2014) y cuyas etapas se representan en el Esquema 2.6.



Población de proteínas de una célula con distintos niveles de acetilación.

Las proteínas se desnaturalizan y con anhídrido acético isotópico se acetilan químicamente todas las lisinas no acetiladas.

La proteína se digiere con proteasas y los péptidos se inyectan en una columna de LC-MS/MS.

Se compara la población de un determinado péptido acetilado químicamente (rojo) con aquella acetilada de manera endógena (negro).

Esquema 2.6. Diagrama explicativo de la cuantificación del grado de acetilación en péptidos de proteína. Este esquema ha sido tomado de Baeza et al., *J. Biol. Chem.* (2014);289(31):21326-38. doi: 10.1074/jbc.M114.581843.

Esta parte fue posible gracias a la colaboración del Dr. Josué Baeza (Wisconsin Institute for Discovery, Madison, WI, EEUU). Los experimentos se llevaron a cabo con Pck1 de rata purificada de células HEK293T (véase 2.8). 2 µg de esta proteína se resuspendieron en 25 µL de tampón 200 mM NH₄HCO₃, pH 8, 6 M urea filtrada y desionizada y 5 mM DTT. Cada muestra se desnaturalizó y se redujo por calor a 60°C durante 20 minutos en un Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 1000 rpm. Se añadió iodoacetamida a cada muestra hasta una concentración de 80 mM para alquilar cisteínas. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos y 1000 rpm. Las lisinas

no acetiladas se marcaron químicamente incubando las muestras a 60°C durante 20 minutos con D6-anhídrido acético (99.8% pureza, Cambridge Isotopes, Tewksbury, MA, EEUU). La adición de este isótopo produce una caída en el pH de la muestra. Entonces, tras la incubación se añadió NH₄OH hasta alcanzar un pH~8.5. Se repitió el proceso de incubación con D6-anhídrido acético. Para hidrolizar los ésteres O-acetilo que pudieran haberse formado durante la acetilación química, la muestra se llevó a pH~8.5 y se incubó a 60°C durante otros 20 minutos. La concentración de urea se llevó a 2 M tras la adición de 100 mM NH₄HCO₃, pH 8.5, hasta un volumen final de 75 µL. Las muestras se digirieron con 1 µg de tripsina a 37°C durante 4 horas y 500 rpm. Para incrementar la cobertura de péptidos detectados, se llevó a cabo una segunda digestión con 0.5 µg de GluC, una endoproteinasa que corta en el extremo C-terminal del residuo ácido glutámico. El volumen final fue de 150 µL y la incubación continuó toda la noche a 37° C. Se eliminó la sal de las muestras antes del MS siguiendo el protocolo descrito previamente (Fan et al., 2016). Las columnas de desalinizado se prepararon utilizando 3M Empore™ C18 47mm extraction disks (model 2215) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Los péptidos se separaron en un espectrómetro de masas hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Q Exactive) (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU) equipado con Dionex Ultimate 3000 RSLC nano HPLC y una columna de fase reversa Waters Atlantis dC18 (100 µm × 150 mm) (Atlantis, Milford, MA, EEUU). La fase móvil consistió en 0.1% ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico (B). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal del 2 al 40% de B con un flujo de 0.8 µL/min a lo largo de 40 minutos inyectado por ionización de nanoelectrospray. La búsqueda de péptidos se llevó a cabo por medio de una base de datos Mascot. Se seleccionó tripsina y GluC como enzimas de corte, se consideró la alquilación de cisteínas como modificación fija y la oxidación de metioninas y la acetilación de lisinas (D6 y D3) se consideraron modificaciones variables. La tolerancia fue de ±10 ppm y ±0.1Da.

2.12. Experimentos de dinámica molecular

Este trabajo se realizó con la colaboración del Dr. Francisco Corzana (Universidad de La Rioja, España). La dinámica molecular permite conocer, a través de simulaciones, el comportamiento que tendría una proteína en unas condiciones de temperatura y presión en una solución acuosa. Estas técnicas se llevan a cabo computacionalmente a partir de estructuras de proteína ya conocidas. Se decidió comparar el comportamiento de la Pck1 salvaje de rata y la variante K91AcK. Las simulaciones se llevaron a cabo utilizando AMBER 12 (Case et al., 2012) y el campo de fuerza FF14SB (Maier et al., 2015). La estructura cristalina que se empleó fue la Pck1 de rata en complejo con oxalato y GTP (PDB 3DT2). La estructura se modificó para incorporar la acetil-lisina en posición 91 según los parámetros previamente publicados (Papamokos et al., 2012). El complejo fue sumergido en una caja de 10 Å de moléculas TIP3P de agua (Kiyohara et al., 1998), que es el modelo estándar de agua que se utiliza en simulaciones. En primer lugar, se minimizaron las posiciones del solvente y luego las de los átomos de la celdilla de simulación. El sistema se calentó desde 0 hasta 300 K gradualmente bajo una presión constante de 1 atm. Se aplicaron restricciones de 30 kcal mol⁻¹ al soluto y el esquema de temperaturas de Andersen. Los intervalos durante el calentamiento fueron de 1 fs permitiendo el ajuste homogéneo. Los efectos electrostáticos se modelaron según el método particle-mesh-Ewald (Darden et al., 1993) y se limitaron a 8 Å las interacciones de Lennard-Jones y las electrostáticas. El sistema se equilibró durante 2 ns con un intervalo de 2 fs, volumen y temperatura constantes (300 K). Se generaron trayectorias durante 600 ns bajo esas condiciones.

2.13. Experimentos en células de mamífero

En esta sección se describen los experimentos realizados en células eucariotas. Por motivos organizativos y de comprensión ya se habló de la purificación de Pck1 a partir de células HEK293T en el punto 2.8. Las líneas celulares que se utilizaron fueron las

HEK293T y las HepG2. Como se ha mencionado anteriormente, el origen de las células HEK293T es el tejido renal mientras las HepG2 son células humanas de origen hepático. Salvo que sea especificado de otra forma, las células HEK293T se cultivaron en DMEM con 10% FBS y en el caso de las células HepG2 se utilizó MEM suplementado con un 10% de FBS.

2.13.1. Transfección de las células

La técnica de transfección se explicó en el punto 2.8. Sin embargo, el método de transfección que se utilizó en esta sección se basó en la formación de liposomas, vesículas que pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar el plásmido en el interior de la célula. Dependiendo del experimento se utilizaron como reactivos o GeneJuice (Millipore, Billerica, MA, EEUU), o Lipofectamine 2000 o Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). Se llevaron a cabo dos tipos de transfección, la directa y la reversa.

2.13.1.1. Transfección directa

Las células se crecieron en frascos de 25 o 75 cm² o en placas de 100 o 150 mm de diámetro. Para la siembra, se eliminó el medio con una bomba de vacío, se añadió PBS para lavar las células, el PBS se retiró y se añadió tripsina, incubando a 37° C. Una vez despegadas las células, se diluyeron en función de las necesidades del experimento en medio DMEM suplementado con 10% FBS y se sembraron en placas de 6, 12 o 24 pocillos según el experimento. Las células se sembraron un día antes de la transfección con el fin de alcanzar una confluencia de entre el 60 y el 80 % para el momento de la transfección. Este tipo de transfección se llevó a cabo utilizando GeneJuice. En un tubo de 1.5 mL se añadió medio Optimem (Thermo Fisher, Waltham, EEUU) y el reactivo de transfección GeneJuice, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Pasados 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadió el DNA en una proporción 1:3 (µg/µL) DNA:GeneJuice. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos y se añadió a cada pocillo la cantidad correspondiente de la mezcla.

2.13.1.2. Transfección reversa

La transfección reversa consiste en añadir las células, recién tripsinizadas y resuspendidas en el volumen de medio adecuado tras eliminar la tripsina, a cada pocillo al mismo tiempo que se añade el reactivo de transfección que se ha preparado como en el punto anterior. Las células se van posando sobre el pocillo a la vez que se van transfectando. Todos los reactivos de transfección que se mencionaron al inicio de este apartado (Véase 2.13.1) se usaron para transfección reversa. A diferencia de las células HEK293T, las células HepG2 sólo se transfectaron eficientemente por este método utilizando GeneJuice o Lipofectamine RNAiMAX.

2.13.2. Prueba de expresión y detección de proteínas mediante western blot

A lo largo de esta sección se ha hablado de la detección de proteína o de sus modificaciones como la acetilación por medio de la técnica denominada western blot. Consiste en la transferencia de proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana cuando se genera un campo eléctrico. Posteriormente, se usan anticuerpos para detectar dichas proteínas o alguna de sus propiedades. Los anticuerpos primarios reconocen específicamente epítopos presentes en las proteínas. Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se suele incubar con los anticuerpos secundarios, salvo que el anticuerpo primario lleve un marcaje y no haga este paso necesario. Estos anticuerpos reconocen y se unen a los anticuerpos primarios. La peroxidasa del rábano picante (HRP, Horseradish Peroxidase) conjugada a los anticuerpos secundarios es capaz de catalizar una reacción química que convierte un sustrato determinado en un producto luminiscente, el cual puede detectarse fácilmente mediante película fotográfica o un aparato específico. Con ello se consigue la detección específica de proteínas. Inicialmente esta técnica se utilizó para determinar la expresión de proteínas de interés codificadas por las construcciones pCMP.

En el caso concreto de las pruebas de expresión, las células se sembraron en placas de 24 pocillos, se transfectaron y se recogieron en medio PBS. Tras centrifugar a 500 g

durante 5 minutos, se lisaron en tampón de carga de SDS-PAGE y se separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida. Se procedió entonces con el western blot. El protocolo general que se siguió, y que sirve de referencia tanto para los apartados 2.9.2 y 2.9.3 como para los descritos a lo largo de este punto 2.13, fue el siguiente.

- Para detección de Pck1 se utilizaron geles del 10% poliacrilamida, del 8% para la detección de Pgc1 α y del 6% para detectar p300.
- Las proteínas se transfirieron a una membrana utilizando un programa de 100 V durante 90 minutos. Se utilizaron membranas de nitrocelulosa y de PVDF indistintamente.
- Una vez transferidas las proteínas a la membrana, ésta se bloqueó en PBS 0.1% Tween 20 (PBST) y 5% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.
- La solución se descartó y se añadió nueva solución de bloqueo con el anticuerpo primario a la dilución apropiada. La membrana se incubó a 4°C una noche en un balancín. En la Tabla 2.17 se detallan los anticuerpos primarios utilizados.
- Tras la incubación con el/los anticuerpo/s primario/s, la membrana se lavó con PBST tres veces, durante 10 minutos cada una.
- Se añadió solución de bloqueo con el/los anticuerpos secundarios conjugados con la proteína HRP. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución 1:10000 y se compraron a Cell Signal (Anti-ratón-HRP (7076) y anti-conejo-HRP (7074)).
- Los anticuerpos secundarios se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se lavó con PBST tres veces de nuevo y se incubó con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Millipore, Billerica, MA, EEUU). La señal se recogió en película fotográfica.

Tabla 2.17. Relación de anticuerpos primarios utilizados para western blot.				
Anticuerpo	Empresa	Referencia	Origen	Dilución
Anti-Myc	Invitrogen	R950-25	Ratón	1:10000
Anti-DYK	GenScript	A00170-40	Conejo	1:10000
Anti-HA	Santa Cruz	sc-7392	Ratón	1:1000
Anti-Pck1	Santa Cruz	sc-74825	Conejo	1:1000
Anti-Pck1	Abcam	Ab28455	Conejo	1:1000
Anti-SIRT1	Cell Signaling	D739	Conejo	1:1000
Anti-SIRT2	Cell Signaling	D4S6J	Conejo	1:1000
Anti-p300	Novus Biologicals	NBP1-87694	Conejo	1:1000
Anti-PPAR γ	Santa Cruz	sc-7196	Conejo	1:500
Anti-GSK3 β	Cell Signaling	27C10	Conejo	1:1000
Anti-acetil-lisina	Cell Signaling	9814	Conejo	1:1000
Anti-O-GlcNAc	Abcam	Ab2739	Ratón	1:5000
Anti-fosfoSer/Thr	Abcam	Ab17464	Conejo	1:1000
Anti-Actina	Sigma	A2066	Conejo	1:10000
Anti-GAPDH	Genetex	GTX100118	Conejo	1:50000
Anti-Tubulina	Cell Signal	DM1A	Ratón	1:10000

2.13.2.1. Determinación de los niveles de proteínas endógenas

Las células HEK293T (5×10^5) y HepG2 (1×10^6) se crecieron en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas se sustituyó el medio por DMEM a distintas concentraciones de glucosa (2.5, 5, 10, 15, 20 y 25 mM). El medio se preparó mezclando DMEM sin glucosa con DMEM convencional (4.5 g/L = 25 mM glucosa). El experimento se repitió del mismo modo sin y con 10% FBS. Después de 24 horas las células se lisaron en PBS suplementado con 1% NP40, 1 mM PMSF, 0.1 mM leupeptina y 1 mM aprotinina en un volumen de 50 μ L. Los lisados se incubaron 15 minutos en hielo y después de tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se analizó por western blot la presencia de PCK1. Cuando se especifique, se determinaron además los niveles de SIRT1, SIRT2 y p300. El nivel relativo de proteína se determinó por densitometría de bandas usando ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EEUU), normalizando los valores a un control de carga (Actina o Tubulina). Los experimentos se repitieron al menos dos veces.

2.13.3. Detección de los niveles de mRNA de PCK1 endógena por medio de PCR cuantitativa (qPCR).

Para determinar el efecto de cada una de las isoformas de Pgc1 α porcina sobre su actividad transcripcional se cuantificó la cantidad de mRNA de PCK1 que inducía cada una de las formas de Pgc1 α comparada con las células control, transfectadas con el plásmido vacío. El sistema de detección es semejante al descrito en el punto 2.4.1. Se sembraron 4x10⁴ células HEK293T en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas se transfectaron utilizando GeneJuice y 24 horas más tarde se extrajo el mRNA utilizando Cells-to-Ct 1 step Taqman kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se amplificó utilizando una sonda fluorescente específica para el gen *PCK1* humano, marcada con el fluorocromo FAM. Se utilizó como control interno una sonda dirigida al mRNA de *GAPDH* marcada con el fluorocromo VIC.

La mezcla de PCR consistió en 2.5 μ L de Taqman 1 Step qRT-PCR, 1 μ L del extracto celular que contenía el mRNA, 0.5 μ L de cada uno de los ensayos de expresión que incluían las sondas fluorescentes y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 10 μ L. El programa que se utilizó fue el siguiente (Tabla 2.18).

Tabla 2.18. Etapas de la reacción de qPCR.			
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Número de ciclos
Transcripción reversa	50	300	1
Desnaturalización	95	20	1
Amplificación	95	15	40
	60	60	

La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Mx3005P qPCR System (Agilent, Santa Clara, CA, EEUU). El mRNA de *PCK1* se cuantificó como $1/2^{\Delta Ct}$; donde ΔCt es (FAM)*PCK1*_{Ct} - (VIC)*GAPDH*_{Ct} de cada muestra.

2.13.4. Inmunoprecipitación de proteínas

La inmunoprecipitación de proteínas consiste en la purificación de proteínas a partir de extractos celulares utilizando anticuerpos específicos. Esto permite estudiar algunas propiedades de las proteínas como son las modificaciones post-traduccionales o PTMs.

El protocolo general que se aplicó para las inmunoprecipitaciones es el siguiente. Tras lisis de las células en el tampón adecuado (los tampones usados para cada proteína se detallan más adelante), las proteínas en solución se incubaron en un tubo de 1.5 mL con 250-500 μ L de tampón con el anticuerpo primario adecuado una noche a 4°C en agitación. El complejo antígeno-anticuerpo se conjugó con Dynabeads Protein G (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). La proteína G es una proteína que, con mayor o menor eficacia, se une a inmunoglobulinas. En las “Dynabeads”, la proteína G está conjugada con nanopartículas imantadas que pueden ser separadas del resto de la solución utilizando un imán. Se añadieron 20-30 μ L de Proteína G conjugada previamente equilibrada en el tampón de inmunoprecipitación. Se incubaron las “Dynabeads” durante 2 horas a 4°C para formar el complejo antígeno-anticuerpo-Dynabead. Con un imán se separaron estos complejos del resto de la solución quedando en un lateral del tubo. La solución que contenía las proteínas no unidas se descartó y se añadió más tampón de inmunoprecipitación. Se incubó la mezcla 10 minutos y se repitió este proceso de lavado de los complejos dos veces más. Finalmente, los complejos se resuspendieron en tampón de carga y las proteínas se analizaron por western blot. Para la inmunoprecipitación se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios (véase Tabla 2.19).

Tabla 2.19. Relación de anticuerpos primarios utilizados para las inmunoprecipitaciones.				
Anticuerpo	Empresa	Referencia	Origen	Dilución
Anti-Myc	Invitrogen	13-2500	Ratón	1:100
Anti-HA	Abcam	Ab9110	Conejo	1:100
Anti-Pck1	Santa Cruz	sc-74825	Conejo	1:50
Anti-Pck1	Abcam	Ab28455	Conejo	1:50
Anti-acetil-lisina	Cell Signaling	9814	Conejo	1:250

2.13.4.1. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 porcina en células HEK293T

Las células HEK293T (7.5×10^5) se crecieron en placas de 6 pocillos. Las células de cada pocillo se transfectaron con 1 μ g de uno de los clones pCMP3 (Pck1 salvaje), pCMP4 (Pck1 p.M139L), pCMP6 (Pck1 p.K14A) o pCMP7 (Pck1 p.K14A+M139L) (véanse Tabla 2.5 y Tabla 2.10). Estas construcciones expresaron las distintas variantes de Pck1 porcina con el epítipo myc en el extremo amino terminal. Las células se lisaron en PBS con 0.5% Tween 20, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 μ M benzamidina, 10 μ M tricostatina A y 0.5 mM leupeptina. Las células se incubaron en hielo durante 15 minutos y el lisado se centrifugó a 14000 g. Se determinó la concentración de proteína por el método Bradford y 40 μ g de esta proteína se incubaron con 1 μ g de anti-acetil-lisina en un volumen total de 250 μ L una noche a 4°C. Se añadieron las “Dynabeads” y tras dos horas se hicieron tres lavados con tampón de lisis. Los complejos se resuspendieron en 20 μ L de tampón de carga y se analizaron por western blot. Para detectar myc-Pck1 se utilizó anti-myc y las bandas resultantes se analizaron por densitometría utilizando ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EEUU).

El mismo experimento se repitió inmunoprecipitando con anti-myc Pck1 salvaje y p.M139L. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y la banda correspondiente a Pck1 se recortó. Las bandas se enviaron para el análisis de sitios acetilados por MS en el IDIBELL (Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, España).

2.13.4.2. Análisis de PTMs en Pgc1 α y su interacción con PPAR γ

Las células HEK293T (7.5×10^5) se crecieron en placas de 6 pocillos. Se transfectaron independientemente 2 μ g de pCMP16 o pCMP17 (véanse Tabla 2.5 y Tabla 2.10), correspondientes a construcciones que expresaron Pgc1 α salvaje y la variante p.C430S. 48 horas después de la transfección se recogieron las células y se lisaron en 500 μ L de 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1 mM EDTA, 2 mM NAM, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 μ M benzamidina y 0.5 mM leupeptina. Se utilizó todo el lisado para la inmunoprecipitación. La Pgc1 α -myc sobreexpresada se inmunoprecipitó con 5 μ g de

anti-myc (clon 9E10), utilizando 25 μ L de “Dynabeads”. Tras la incubación y los lavados la proteína se separó en geles de poliacrilamida por medio de SDS-PAGE y se transfirió a membrana de PVDF. Por medio de western blot, se detectó el nivel de acetilación, fosforilación y O-glicosilación (O-GlcNAc) con los correspondientes anticuerpos y se detectó Pgc1 α utilizando anti-myc. Los niveles relativos de estas modificaciones se calcularon por densitometría de bandas y se normalizaron al contenido en myc (Pgc1 α). También se detectó PPAR γ para comprobar el nivel de interacción. Cuando se especifique el experimento se repitió con una de estas dos modificaciones: (1) pCMP8 (DYK-O-GT) se co-transfectó con cada una de las construcciones pCMP16 o pCMP17; (2) se añadió el compuesto PUGNAc, un inhibidor de O-GlcNAcasas, enzimas que eliminan grupos O-GlcNAc de proteínas. Este compuesto se añadió a una concentración final de 100 μ M, 18 horas antes de recoger las células.

2.13.4.3. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 de rata sobreexpresando SIRT1

Las células HEK293T (7.5×10^5) se transfectaron con pCMP23 (HA-Pck1-6xHis) sólo o conjuntamente con pCMP24 (Flag-SIRT1) o pCMP25 (Flag-SIRT1 p.H363Y). Las células se recogieron en PBS con 1 mM NAM y se lisaron en PBS, 1% NP-40, 1 mM PMSF y 1 mM NAM en hielo. Después de 15 minutos las células se congelaron y descongelaron tres veces en nitrógeno líquido para asegurar la correcta lisis. Los lisados se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos y se incubó el sobrenadante con 4 μ g de anti-HA. Se añadieron 30 μ L de “Dynabeads” y después de los correspondientes lavados en tampón de lisis se resuspendieron en tampón de carga. La proteína se separó en un gel de poliacrilamida y se analizó el nivel de acetilación relativo a la cantidad de proteína por medio de western blot.

2.13.4.4. Análisis del nivel de acetilación de Pck1 al silenciar SIRT1 o SIRT2

Una de las formas de conocer la función de una determinada proteína es inhibiéndola o silenciando su expresión. En el primer caso se suelen utilizar compuestos químicos con el inconveniente de que no todos los compuestos son específicos de una sola proteína,

y en el segundo una de las opciones es utilizar RNA de interferencia (RNAi). En el RNAi se usan sondas de RNA que hibridan dentro de la célula con el mRNA de la proteína que se pretende silenciar impidiendo su traducción. Para contrastar los datos obtenidos en el punto anterior se decidió silenciar independientemente SIRT1 y SIRT2 en células HEK293T (7.5 x 10⁵ células/pocillo) y HepG2 (1 x 10⁶ células/pocillo) y determinar el nivel de acetilación de PCK1 endógena y Pck1 de rata sobreexpresada. Las sondas de RNAi que se utilizaron fueron:

-SiSIRT1: 5'-CAGGUUGCGGGAAUCCAAAGGAUAA-3'

-Control SIRT1*: 5'-CAGCGUGGGUAAACCGAAAGGUUAA-3'

-SiSIRT2: 5'-GAGGCCAUCUUUGAGAUCAGCUAAU-3'

-Control SIRT2*: 5'-GAGACCUUUGUGAUAAACCGUCGAUU-3'

Los oligonucleótidos marcados con "" indican RNAi "scramble", es decir, el mismo oligonucleótido que el de silenciamiento, pero cuyos nucleótidos han sido cambiados de orden, barajados, aleatoriamente)

Estas sondas se generaron utilizando Block-iT™ RNAi Designer (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>). Para la transfección reversa de las células con estas sondas se utilizó Lipofectamine RNAiMAX siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración final de las sondas en el medio fue de 50 nM. Este experimento también se llevó a cabo co-transfectando los RNAi con pCMP23 (HA-Pck1-6xHis). En este caso, los liposomas de DNA plasmídico se prepararon en un tubo aparte utilizando GeneJuice.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando anti-Pck1 tal y como se describió en 2.13.4. En el caso de las células que sobreexpresaron HA-Pck1-6xHis se utilizó una resina de cobalto para la purificación tal y como se explicó en el punto 2.8.2. Además, se analizó la actividad de estas muestras de Pck1 como se ha descrito en 2.9.1.1 y 2.9.1.2, en ambos sentidos de la reacción.

2.13.4.5. Análisis de los efectos del silenciamiento de GSK3 β sobre las modificaciones postraduccionales de Pck1

El experimento de silenciamiento se llevó a cabo del mismo modo que en 2.13.4.4, pero utilizando siRNA específico para GSK3 β (Silencer Validated siRNA assay #6239, Thermo Fisher).

2.13.5. Ensayos de determinación de síntesis de metabolitos en células HEK293T

Una de las formas de conocer la funcionalidad de ciertas proteínas involucradas en la gluconeogénesis o en la síntesis de lípidos es evaluar la capacidad de potenciar la síntesis de glucosa o triglicéridos en células. Estos ensayos se realizaron como se indica a continuación.

2.13.5.1. Ensayos de determinación de la capacidad gluconeogénica de Pck1 porcina

En este apartado se explica el protocolo para la determinación de la capacidad gluconeogénica de Pck1 salvaje y p.M139L porcinas. Más adelante se especificarán las modificaciones de este protocolo para cada proteína estudiada. Las células (5×10^5) se transfectaron (1 μ g de plásmido) en placas de 6 pocillos con los plásmidos deseados y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% FBS una noche. Las células se lavaron con PBS y se añadió 1 mL de medio de producción de glucosa (DMEM sin rojo fenol y sin glucosa suplementado con 2 mM piruvato de sodio y 20 mM lactato de sodio). Tras 3 horas de incubación en condiciones estándar, se recolectó el medio y se utilizó un ensayo colorimétrico (Sigma GAGO20, Sigma, St. Louis, MO, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo indirecto presenta alta sensibilidad y especificidad y permite la cuantificación utilizando una solución de glucosa de referencia. La mezcla de enzimas permite oxidar la glucosa y dar lugar a H₂O₂ que es capaz de oxidar el compuesto o-dianisidina, generando un compuesto marrón estable. La reacción se para con H₂SO₄, dando lugar a un compuesto rosa más estable que puede cuantificarse a 540 nm en un espectrofotómetro. La producción de glucosa se normalizó al contenido de proteína de los extractos celulares cuantificado por Bradford. Como

control se usaron células transfectadas con el plásmido vacío. La expresión de proteínas se comprobó por western blot.

2.13.5.2. Ensayos de determinación de la capacidad gluconeogénica de Pgc1 α porcina

El ensayo se efectuó igual que en el punto anterior con las siguientes modificaciones. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 1 μ g de cada una de las construcciones que expresaban Pgc1 α salvaje y p.C430S (pCMP16 y 17). El tiempo de incubación antes de recoger el medio fue 6 horas.

2.13.5.3. Influencia de la acetilación en la capacidad gluconeogénica de Pck1 de rata

El ensayo se llevó a cabo en placas de 12 pocillos. Se co-transfectaron varias construcciones en diversas combinaciones. Estas construcciones fueron: pCMP23 (HA-Pck1-6xHis), pCMP13 (p300-HA) y pCMP24 (Flag-SIRT1). Se determinó la cantidad de glucosa producida a diversos tiempos: 1, 2, 4 y 6 horas.

2.13.5.4. Determinación de la capacidad de Pck1 porcina de inducir lipogénesis

Las células HEK293T se crecieron en placas de 24 pocillos previamente tratados con poly-L-lisina, un reactivo que favorece la adhesión celular. Las células se transfectaron con pCMP3 (Pck1 porcina salvaje) o pCMP4 (variante porcina Pck1 p.M139L). 24 horas después el medio se reemplazó por el mismo medio suplementado con 250 μ M palmitato (inductor de la síntesis de lípidos). Después de 24 horas las células se lavaron con PBS y se fijaron en PBS suplementado con 3.7% formaldehído a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron con agua dos veces y se trataron con 60% isopropanol durante 5 minutos. Se secaron los pocillos y las células se tiñeron con Oil Red O (Sigma, preparado al 0.2% en 60% isopropanol), que tiñe triglicéridos celulares. Después de 30 minutos de incubación en agitación el excedente de tinción se descartó y los pocillos se lavaron rápidamente con agua destilada cuatro veces. Se añadió 1 mL de 100% isopropanol a cada pocillo y se incubó 1 hora en agitación. El isopropanol adquirió coloración roja tras disolver el Oil Red O unido a lípidos. El contenido en

triglicéridos celulares se determinó a 500 nm en un espectrofotómetro utilizando como blanco 100% isopropanol. Igualmente, la producción de lípidos se normalizó al contenido de proteína de los extractos celulares cuantificado por Bradford. Como control se usaron células transfectadas con el plásmido vacío. La expresión de proteínas se comprobó por western blot.

2.13.6. Determinación de la capacidad glicolítica en células HEK293T

La capacidad de captación de glucosa se determinó utilizando el ensayo Glucose-Uptake Glo™ (Promega, Madison, WI, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la capacidad de las células de generar un compuesto no metabolizable (2-deoxiglucosa-6-fosfafo, 2G6P) a partir de 2-deoxiglucosa. Por medio de un conjunto de enzimas y sustratos se produce luminiscencia detectable con un luminómetro. Las células HEK293T (2.5×10^4 células/pocillo) se transfectaron como se ha descrito en 2.13.1.2 y se crecieron en placas de 96 pocillos. Pasadas 24 horas, el medio se retiró y los pocillos se lavaron con PBS. Se añadió PBS suplementado con 1 mM 2-deoxiglucosa y, tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, el PBS suplementado se retiró. Los pocillos se lavaron y se procedió a la lisis celular y posterior reacción enzimática, detectándose la luminiscencia pasadas 2 horas. Como controles se usaron células transfectadas con plásmido vacío y células transfectadas con plásmido vacío que no fueron tratadas con 2-deoxiglucosa (blanco). El contenido en Pck1 salvaje y Pck1 S90A se determinó por western blot y los resultados se normalizaron al contenido total de proteína determinado por Bradford.

2.13.7. Determinación de la estabilidad de proteínas sobreexpresadas en células

Una forma de conocer diferencias en la estabilidad de proteínas dentro de una célula es determinando la desaparición de la misma a lo largo del tiempo. Para ello, las células se tratan con antibióticos que inhiben la producción de proteína en el ribosoma. Entre ellos se encuentra la cicloheximida (CHX) y la técnica que se usa para determinar la presencia de proteína es el western blot.

2.13.7.1. Efecto de la acetilación sobre la estabilidad de Pck1

Las células HEK293T (1.25×10^5) se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 100 ng de cada uno de los clones pCMP3, pCMP4, pCMP6 o pCMP7 (véanse Tabla 2.5 y Tabla 2.10). Estos clones expresaron Pck1 salvaje, la variante p.M139L, p.K14A y p.K14A-M139L marcados con el epítipo myc. Después de 24 horas, se reemplazó el medio por nuevo medio suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX. Tras 24 horas, las células se recogieron en 200 μL de tampón de carga, las muestras se hirvieron y las proteínas se separaron por SDS-PAGE. El nivel de proteína se determinó por western blot detectando el epítipo myc, comparando con la expresión de Pck1 a tiempo cero y normalizando a un control de carga. Debido al largo tiempo de vida media y estabilidad de los controles de carga como actina o GAPDH estos experimentos permitieron comparar el tiempo inicial con el final. Las bandas se analizaron por densitometría utilizando ImageJ.

2.13.7.2. Estabilidad de Pgc1 α porcina en células

El experimento fue semejante al descrito en el punto anterior. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos. La transfección requirió 1 μg de plásmido (pCMP16 ó 17) que codificaba Pgc1 α -myc salvaje o p.C430S-myc porcina. Tras la adición de CHX, se tomaron muestras a distintos tiempos: 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. El análisis se efectuó por medio de western blot detectando el epítipo myc y las bandas se analizaron utilizando ImageJ.

2.13.7.3. Estabilidad de Pck1 y los mutantes S90A y T92A

El experimento fue el mismo que el descrito en 2.13.7.1, pero se transfectaron 20 ng de cada plásmido y las muestras se recogieron tras 0, 2, 4 y 8 horas.

2.13.8. Localización subcelular de las isoformas de Pgc1 α

Este experimento se realizó utilizando las construcciones pCMP20 y 21 (véase Tabla 2.10) que expresaron Pgc1 α -myc-GFP salvaje y la variante p.C430S. La GFP presenta

autofluorescencia que permite marcar las proteínas y detectarlas al microscopio. Las células HEK293T se crecieron y transfectaron como ya se ha descrito en placas de 24 pocillos sobre un cubre-objetos circular de 10 mm de diámetro. 24 horas después de la transfección el medio se reemplazó con medio nuevo suplementado con 2 μ M Hoechst 33342 (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). El Hoechst 33342 tiñe los núcleos celulares, lugar donde se ha descrito PGC1 α . Se incubaron las células 25 minutos. El medio se descartó y se añadió PBS suplementado con 3.7% formaldehído y se fijaron las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron sobre porta-objetos utilizando ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher, Waltham, MA, EEUU). Se analizaron las muestras utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B (Leica, Wetzlar, Alemania).

2.13.9. Fraccionamiento celular

Para la determinación de la actividad PCK1 en células a las que se les había silenciado SIRT1 o SIRT2, se decidió purificar la fracción citosólica de células HEK293T y HepG2. El protocolo de silenciamiento fue idéntico al descrito en 2.13.4.4. Las células se recogieron en PBS-NAM y se lisaron en 20 mM HEPES, 250 mM sacarosa, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA e inhibidores de proteasas. Tras 20 minutos en hielo, se centrifugaron las muestras a 700 g. El pellet, conteniendo los núcleos íntegros, se descartó. El sobrenadante se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos. Se descartó de nuevo el pellet que contenía las mitocondrias. Se analizó la actividad PCK1 como se ha descrito en 2.9.1.1 y 2.9.1.2 en ambos sentidos de la reacción. Los valores de actividad se normalizaron al contenido en PCK1 analizado por western blot.

2.13.10. Ensayos de inhibición de kinasas

Las células HEK293T (7.5×10^5) se sembraron en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, el medio se sustituyó por medio completo suplementado con uno de los siguientes inhibidores de kinasas: 5 μ M dorsomorfina (inhibidor de AMPK), 5 μ M CHIR99021 (inhibidor de GSK3), 5 μ M SB 203580 (inhibidor de MAPK) ó 20 nM

rapamicina (inhibidor de mTOR). Los compuestos se disolvieron en DMSO a una concentración 1000 veces superior a la usada en el medio. Cuando se especifica, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 se llevó a cabo a una concentración de 10 μ M. Como control se utilizaron células tratadas con DMSO. Tras 18 horas, las células se recogieron y se lisaron. La Pck1 fue purificada y sometida a diversos análisis.

2.14. Purificación y análisis de la actividad Pck1 a partir de muestras de tejido murino

Para comprobar los efectos de la actividad deacetilasa de SIRT1 en PCK1 se decidió purificar Pck1 a partir de muestras de hígado y riñón de ratones salvajes (Sirt1^{+/+}) y deficientes en SIRT1 o “knock-out” (SIRT1 KO o Sirt1^{-/-}) y analizar tanto su actividad como el nivel de acetilación. Se utilizaron muestras de 3 animales por cada grupo.

Durante todos los pasos de purificación la Pck1 se siguió a través de las distintas fracciones determinando su actividad en ambos sentidos de la reacción (2.9.1.1 y 2.9.1.2). Las muestras de tejido se resuspendieron en tampón 25 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM sacarosa, 10 mM DTT, 2 mM NAM, 1 mM NaF y 2 mM PMSF y se centrifugaron a 50000 g y 4°C durante 45 minutos. El pellet se descartó. Se añadió sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar una saturación del 45%. Tras 1 hora de incubación a 4°C, las muestras se centrifugaron a 5000 g y 4°C durante 15 minutos. El pellet se descartó y al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio hasta alcanzar una saturación del 70%. Tras 1 h de incubación, las muestras se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se descartó y el pellet, que contenía Pck1, se resuspendió en 25 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM DTT, 2 mM NAM, 1 mM NaF y 2 mM PMSF. Las muestras se cargaron en una columna de intercambio catiónico Aurum Cation Exchange (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) equilibrada en el mismo tampón. Tras cargar la muestra, la columna se lavó dos veces más con el mismo tampón, recogiendo Pck1 en estos primeros lavados ya que no se unió a la columna. Las muestras se cargaron en una columna de intercambio aniónico Pierce™ Strong Anion Exchange Mini Spin Column (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, EEUU). Pck1 se eluyó en el mismo tampón utilizando un gradiente de NaCl de 0 a 1000 mM. Se detectó Pck1 en las fracciones eluidas entre 200 y 400 mM. La pureza de estas fracciones se analizó por SDS-PAGE y se concentraron. Se determinaron tanto la actividad de Pck1 en condiciones saturantes de sustrato como las constantes cinéticas para los sustratos PEP y GDP. Así mismo, por medio de western-blot se analizó el nivel de acetilación.

2.15. Otros análisis estadísticos

Salvo los estudios de asociación y epistasia, para el resto de experimentos bioquímicos, biofísicos y biológicos se llevaron a cabo los siguientes análisis estadísticos. En todos los casos se comprobó la normalidad de los datos por medio del test Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre tres o más grupos se llevaron a cabo por medio de análisis de varianza (ANOVA), para determinar diferencias entre esos grupos, seguidos de un test *post-hoc* de Tukey para determinar las diferencias grupo-grupo. Las comparaciones entre dos grupos se llevaron a cabo por medio de test-t. En el caso de los datos que no siguieron una distribución normal, las diferencias entre grupos se analizaron por el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de Wilcoxon ajustado por el método Bonferroni para determinar las diferencias grupo-grupo.

3. Resultados

3.1. Efectos de la variante M139L en la Pck1 porcina sobre el contenido de grasa en el cerdo

La combinación del descenso en el contenido en tocino dorsal y el incremento de grasa muscular es un objetivo importante para la mejora genética porcina. Este efecto ha sido observado para otros polimorfismos como el de *IGF2* porcino (Jeon et al., 1999; Van Laere et al., 2003; Nezer et al., 1999). Sin embargo, la búsqueda de otros polimorfismos con efectos fenotípicos semejantes resulta importante desde el punto de vista productivo. La capacidad del ratón transgénico que sobreexpresa *Pck1* en músculo y que presenta mayor contenido de grasa intramuscular y un descenso claro de la grasa subcutánea (Hakimi et al., 2007) fue el motivo que llevó al análisis del gen de la *Pck1* porcina.

3.1.1. Análisis de la secuencia del gen *Pck1* porcino

En primer lugar, se estudió la posible presencia de polimorfismos tanto en la región promotora como en la codificante del gen de la *Pck1* porcina utilizando para ello dos razas genéticamente alejadas como son los animales Ibéricos y los Piètrain que tienen un fenotipo claramente diferenciado. Así, los animales de raza ibérica presentan mayor contenido de grasa intramuscular mientras que los de raza Piètrain son más magros y presentan un contenido bajo en grasa intramuscular. Para la amplificación mediante PCR de la región codificante del gen *Pck1* porcino se utilizaron cinco parejas de cebadores (Tabla 2.1) y se analizaron un total de 27 animales (9 cerdos Ibéricos, 9 de raza Piètrain y 9 de un cruce industrial Duroc x Landrace/Large White). Estos últimos animales procedentes de un cruce industrial se incluyeron con el fin de observar variabilidad.

Se encontraron diversos polimorfismos tanto en la región promotora como en la codificante, pero sólo uno de ellos, localizado en la región codificante, segregó según el siguiente patrón: el alelo (A) está fijado en cerdos Ibéricos mientras que en los animales de raza Piètrain el alelo (C) tiene una frecuencia alélica igual a 0.5 (Figura 3.1). Esta

diferencia resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$). El polimorfismo c.A2456C se localiza en el exón 4 de la región codificante y produce un cambio de metionina (alelo A) a leucina (alelo C) en la posición 139 de la proteína. Este residuo se encuentra en una lámina β alejada del sitio activo de la enzima, pero en una región muy conservada desde el hombre hasta *C. elegans* (Figura 3.2).

Muestra	Secuencia
Pi 4	GTCGCACGCTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 29	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 38	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 41	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 107	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 222	GTCGCACGCTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 226	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 227	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Pi 307	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 1	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 2	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 3	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 4	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 5	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 6	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 7	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 8	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Iber 9	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 2j	GTCGCACGCTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 11j	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 34j	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 42j	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 43j	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 56j	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 60j	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 63j	GTCGCACGMTGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC
Du x LD/LW 64j	GTCGCACGATGTATGTCATCCCGTTCAGCATGGGGC

Figura 3.1. Alineamiento de la región codificante del gen *Pck1* porcino mostrando del nucleótido 2448 al 2483. Las secuencias de 27 animales muestran el polimorfismo en la posición 2456 en rojo. Este polimorfismo segrega de manera diferente entre los tres grupos de animales. Pi = Piètrain, Iber = Ibérico y Du x LD/LW = Duroc x Landrace/Large White. A= Adenina, C= Citosina, G= Guanina, T= Timina y M= Heterocigoto (A/C). La secuencia de referencia usada fue GenBank FJ668384.1.

A

Cerdo	PEDFEKAFNA	RFPGCMKGRT	MYVIPFSMGP	LGSPLSKIGI	ELTDSPYVVA
Humano	EEDFEKAFNA	RFPGCMKGRT	MYVIPFSMGP	LGSPLSKIGI	ELTDSPYVVA
Ratón	EEDFEKAFNA	RFPGCMKGRT	MYVIPFSMGP	LGSPSLAKIGI	ELTDSPYVVA
Vaca	EEDFEKAFNI	RFPGCMKGRT	MYVIPFSMGP	LGSPLSKIGI	ELTDSPYVVT
Pollo	EEDFEKAFNT	RFPGCMQGR	MYVIPFSMGP	IGSPSLAKIGI	ELTDSPYVVA
Drosophila	EKDMQAAIKE	RFPGCMKGRT	MYVIPFSMGP	VGSPLSKIGI	EITDSPYVVE
<i>C. elegans</i>	PEDLATELDS	RFPGCMAGRI	MYVIPFSMGP	VGGPLSKIGI	QLTDSNYVVL
	*	*****	*****	* ** ****	*** **

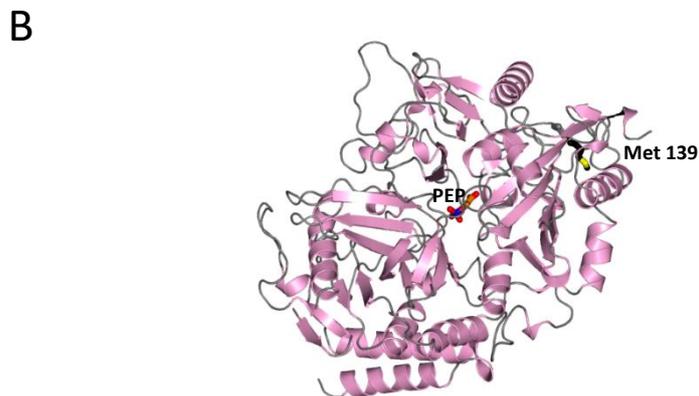


Figura 3.2. La metionina 139 está conservada en diferentes especies. (A) Alineamiento de la región de Pck1 que contiene Met139 mostrando los aminoácidos conservados desde el hombre hasta *C. elegans*. Los asteriscos indican los aminoácidos conservados entre las especies mostradas y en rojo aparece señalada Met139. Los números de acceso GenBank de las distintas especies son NP_001116630 (cerdo), NP_002582 (humano), NP_035174 (ratón), NP_777162 (Vaca), NP_990802 (pollo), NP_001097367 (*Drosophila*), NP_001021589 (*C. elegans*). **(B)** Estructura de cristal de la PCK1 humana (PDB 1KHF) indicando que Met139 está lejos del sitio activo representado por su unión a fosfoenolpiruvato (PEP).

3.1.2. Estudio de asociación del polimorfismo c.A2456C con los caracteres fenotípicos del cruce Duroc x Landrace/Large White (Du X LD/LW)

Para conocer el potencial papel del polimorfismo c.A2456C del gen Pck1 porcino en los caracteres de distribución de grasa y calidad de la carne, se estudió la asociación de dichos caracteres con el polimorfismo c.A2456C en una población de 202 animales Du X LD/LW previamente caracterizados fenotípicamente (Reina et al., 2012). En primer lugar, se analizó el fenotipo para los distintos caracteres y se diseñó un método de discriminación alélica para determinar el genotipo por medio de PCR en tiempo real (RT-

PCR) utilizando sondas fluorescentes, a partir de DNA previamente amplificado (Figura 3.3).

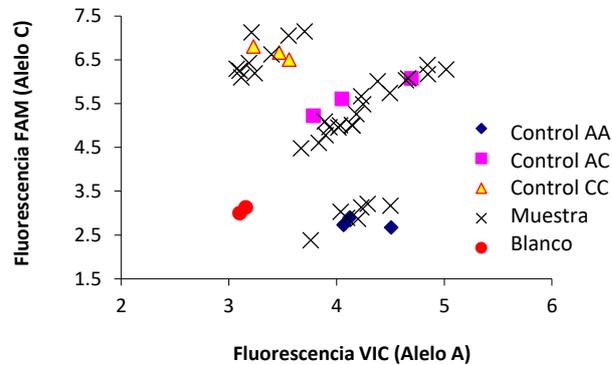


Figura 3.3. Gráfico representativo de un ensayo de discriminación alélica por RT-PCR para el gen *Pck1* porcino. El gráfico mostrado representa la fluorescencia del alelo C (FAM) frente al alelo A (VIC) para uno de los genotipados que se realizaron. Los círculos rojos, los rombos azules, los cuadrados rosas y los triángulos amarillos con borde rojo representan los controles negativos (muestras sin DNA) y los controles positivos AA, AC y CC, respectivamente. Las muestras se representan con un aspa (X).

Las frecuencias genotípicas de la población fueron 0.361, 0.565 y 0.074 para los genotipos AA, AC y CC, respectivamente. El estudio de asociación se realizó utilizando un método Bayesiano. Se estudiaron distintos caracteres, pero especialmente aquellos relacionados con el contenido graso. Se consideraron relevantes aquellos resultados cuya distribución posterior, es decir, la probabilidad de un determinado parámetro teniendo en cuenta los datos experimentales, fue superior a 0.9 o inferior a 0.1. Como se puede apreciar en la Tabla 3.1, el alelo A está asociado a un mayor contenido de grasa intramuscular (entre un 11 y un 20%) en dos músculos, *L. dorsi* y *Ps. major*, y un menor contenido de tocino dorsal (9.9 %), un fenotipo semejante al del ratón transgénico que sobreexpresa *Pck1* en el músculo (Hakimi et al., 2007). Además, se observó una fuerte asociación del alelo A con un aumento de la capacidad de retención de agua a distintos tiempos después del sacrificio, que probablemente está relacionada con los altos valores de pH en el músculo después de 24 horas tras el sacrificio.

Tabla 3.1. Media y desviación estándar (SD) de diversos caracteres de la carne y la canal, estimación de la media posterior del efecto de la sustitución (y desviación estándar posterior, PSD) y probabilidad Bayesiana por encima de cero (P) de la sustitución c.A2456C del gen de la Pck1 porcina.

Carácter	Media (SD)	Efecto de la sustitución (PSD)	CC vs. AA (%)	P ¹
Tocino dorsal	19.88 (5.74)	0.9796 (0.5631)	9.86	0.0409
pH _{24h}	6.34 (0.23)	0.0028 (0.0292)	0.09	0.4618
pH _{45h}	5.64 (0.15)	-0.0215 (0.0192)	-0.68	0.8686
Exudación a los 2 días	4.25 (1.89)	0.3821 (0.2189)	17.98	0.0404
Exudación a los 4 días	6.54 (2.37)	0.6065 (0.2874)	18.54	0.0174
Exudación a los 7 días	8.08 (2.47)	0.5819 (0.3130)	14.40	0.0315
% GIM ² <i>L. dorsi</i>	2.67 (0.95)	-0.2729 (0.0980)	-20.44	0.9973
% GIM ² <i>Ps. major</i>	1.96 (0.44)	-0.1085 (0.0528)	-11.07	0.9800
% GIM ² <i>B. femoralis</i>	2.95 (0.87)	0.0040 (0.0992)	0.27	0.4839
% Contenido graso en el tejido adiposo	77.78 (5.90)	0.1631 (0.5973)	0.42	0.3924

¹P = Probabilidad Bayesiana por encima de cero.
²GIM = grasa intramuscular.

3.1.3. Propiedades cinéticas de Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas

Con el fin de demostrar que los efectos de la sustitución c.A2456C en el gen *Pck1* porcino eran responsables del fenotipo y no se debían a un desequilibrio de ligamiento, se estudiaron las propiedades cinéticas de las enzimas recombinantes salvaje y la variante M139L. Para ello, ambas proteínas se expresaron en bacterias con una cola de histidinas en el extremo amino y se purificaron por medio de una columna de afinidad (Figura 3.4). Se determinaron las constantes cinéticas K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m o eficiencia catalítica para los cinco sustratos de Pck1 en los dos sentidos de la reacción (Tabla 3.2).

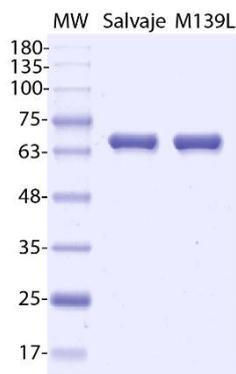


Figura 3.4. Gel del 10% poliacrilamida mostrando Pck1 (salvaje) y la variante Pck1 p.M139L (M139L) purificadas. Los números a la izquierda representan el peso molecular (MW).

Tabla 3.2. Propiedades cinéticas de Pck1 salvaje y variante p.M139L.						
Sustrato	K_m (μM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L
PEP	240±15	381±53	6.8±0.2	10.7±0.5	2.9×10^4	2.8×10^4
KHCO_3	15560±2163	7497±513	10.7±0.5	9.2±0.2	7.1×10^2	1.2×10^3
GDP	27.4±2.4	55±3.6	7.6±0.2	10.7±0.2	2.8×10^5	1.9×10^5
OAA	13.1±1.7	10.6±0.7	46±1.8	32±0.6	3.5×10^6	3.1×10^6
GTP	45.9±3.8	23±3.5	39±1	25±1	8.8×10^5	1.1×10^6

La Pck1 salvaje mostró mayor k_{cat} (entre el 35 y el 60%) para los sustratos OAA y GTP en la reacción gluconeogénica mientras que este parámetro fue un 50% inferior para los sustratos PEP y GDP en la reacción contraria. Estos resultados indican que Pck1 salvaje es capaz de llevar a cabo la reacción gluconeogénica, la que produce PEP a partir de OAA, más rápido que la variante M139L. Sin embargo, no hubo una tendencia clara en el caso de los valores de K_m . Mientras que en Pck1 M139L estos valores fueron más bajos para PEP y GDP, fue mayor en el caso del CO_2 . En general, las eficiencias catalíticas fueron muy semejantes salvo para los sustratos KHCO_3 , GDP y GTP. Pck1 salvaje mostró una eficiencia catalítica mayor para KHCO_3 (2 veces) y GTP (20%) y menor en el caso de GDP (32%) en comparación con Pck1 p.M139L.

3.1.4. Caracterización biofísica de Pck1 salvaje y la variante p.M139L

Con el fin de encontrar diferencias adicionales entre Pck1 y Pck1 p.M139L, se utilizaron distintas técnicas de caracterización físico-química.

En primer lugar, se determinó el espectro lejano de ambas proteínas por medio de dicroísmo circular (DC). Como se ha explicado anteriormente (2.10.1, página 79), esta técnica da información sobre la estructura secundaria de las proteínas. Como puede verse en la figura 3.4, se aprecian diferencias entre Pck1 y Pck1 p.M139L. Sin embargo, no se pudo cuantificar el contenido en los elementos de la estructura secundaria debido a la baja resolución del espectro por debajo de los 200 nm (Figura 3.5).

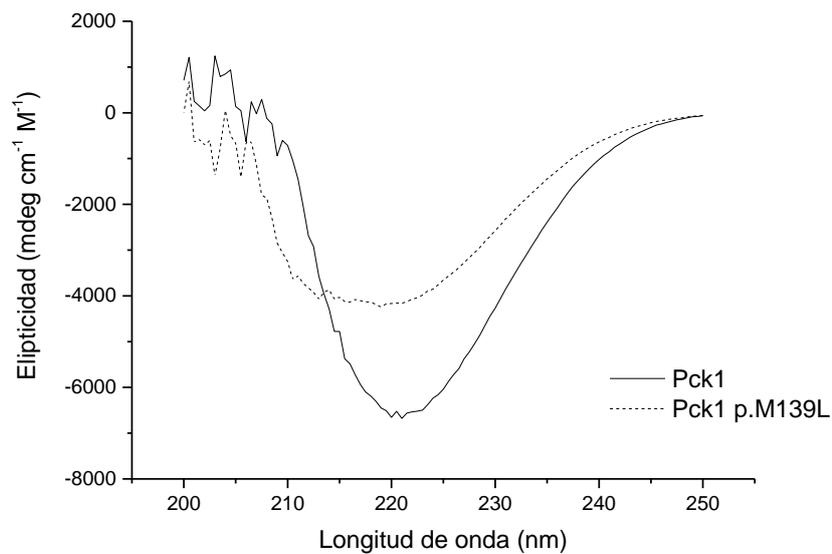


Figura 3.5. Espectro de DC de Pck1 y Pck1 p.M139L. El espectro lejano entre 190 y 250 nm se obtuvo con tres diferentes preparaciones de ambas proteínas a una concentración de 20 μM y a 25°C. La figura muestra un espectro representativo de cada una de las enzimas.

Para determinar posibles diferencias en la estabilidad de ambas proteínas que pudiesen dar cuenta de los resultados obtenidos, se calcularon los valores D_t a 50°C, es decir, el tiempo que es necesario a una determinada temperatura para que la actividad de una enzima descienda un 90%. Estos experimentos se realizaron en la ausencia o presencia de distintos sustratos de PCK1. En la Tabla 3.3 se pueden observar diferencias entre Pck1 salvaje y la variante M139L. En ausencia de sustratos, Pck1 fue 1.3 veces más resistente. De todos los sustratos utilizados, el PEP fue el que mayor resistencia térmica confirió a ambas proteínas, pero la diferencia entre ambas fue pequeña (90 vs. 71 minutos). En el caso del OAA, su presencia no protegió a ninguna de las proteínas de la inactivación térmica. Sin embargo, las mayores diferencias entre Pck1 y Pck1 p.M139L se observaron en presencia de GDP o GTP. En ambos casos, la resistencia a la inactivación de Pck1 fue 2 veces mayor que en el caso de la variante M139L, sugiriendo que la sustitución M139L tiene efectos en el sitio de unión a nucleótidos de la enzima.

Tabla 3.3. Valores Dt (minutos) a 50°C para Pck1 salvaje y Pck1 p.M139L en presencia y en ausencia de sustratos.			
Sustrato	Salvaje	M139L	p ¹
No sustrato	12.2±0.5	9.3±0.3	**
OAA	12.2±2.1	11.2±4.7	ns
GTP	18.8±0.8	8.8±0.9	***
PEP	89.7±7.6	71±7.8	*
GDP	24.3±0.6	11.8±1.8	***

¹Test-t (n=3); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, ns: no significativo.

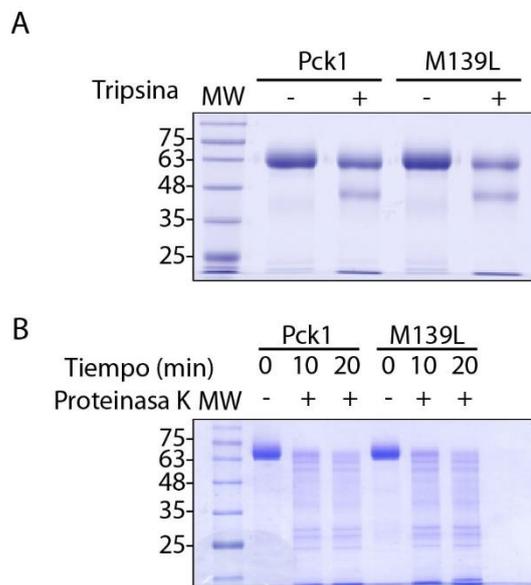


Figura 3.6. Sensibilidad proteolítica de Pck1 y Pck1 p.M139L en presencia de tripsina o proteinasa K. (A) El ensayo se llevó a cabo preparando tripsina a una concentración de 10 µg/mL y mezclando 2 µL de esta solución con otros 10 µL de Pck1 (0.5 mg/mL). La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 18 horas. (B) El ensayo en presencia de proteinasa K se realizó preparando la proteasa a una concentración de 2 µg/mL. La proteasa y Pck1 se mezclaron en las mismas proporciones que en (A) y se incubó a 37°C durante 10 y 20 minutos. Las reacciones se pararon añadiendo tampón de carga para SDS-PAGE y las muestras se hirvieron durante 5 minutos. MW= Marcador de pesos moleculares, Pck1 = Pck1, M139L= Pck1 p.M139L. Los números indican el peso molecular.

Además, se comparó la susceptibilidad de ambas enzimas a la degradación proteolítica utilizando tripsina o proteinasa K, lo que podría indicar diferencias estructurales entre ambas. El análisis por SDS-PAGE de los productos proteolíticos no mostró diferencias significativas (Figura 3.6).

Finalmente, con el fin de determinar diferencias estructurales entre ambas proteínas, se decidió cristalizarlas para determinar su estructura por medio de cristalografía de rayos X. Pese a los numerosos intentos de cristalizar ambas proteínas (cerca de 600 condiciones distintas) tanto en ausencia como presencia de sustratos no se obtuvo cristal alguno.

3.1.5. Determinación de los efectos de la mutación p.M139L en Pck1 de rata y Pck1 quimera cerdo/rata (N-terminal/C-terminal)

Los resultados anteriores mostraron que la sustitución p.M139L produjo un cambio en las propiedades cinéticas e indicaron cambios de estructura entre ambas isoformas de Pck1 porcina, pero no fue posible cristalizar ninguna de las isoformas. Puesto que la Pck1 de rata se ha cristalizado previamente (Johnson and Holyoak, 2010, 2012; Johnson et al., 2016), se decidió investigar si el mismo polimorfismo porcino era capaz de reproducir los efectos en la enzima de rata, introduciendo la sustitución M139L por mutagénesis dirigida. Sin embargo, los resultados mostraron que la mutación p.M139L en Pck1 de rata no reprodujo los resultados cinéticos obtenidos en su homóloga porcina y tanto Pck1 como la variante p.M139L se comportaron de un modo muy semejante (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Propiedades cinéticas de Pck1 salvaje y la variante p.M139L en rata.						
Sustrato	K_m (μM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L
PEP	486±18	471±18	21±0.3	17±0.3	4.3×10^4	3.6×10^4
KHCO ₃	9800±358	7366±325	16±0.4	12±0.4	1.6×10^3	1.6×10^3
GDP	53±3	31±2	18±0.3	12±0.3	3.6×10^5	3.8×10^5
OAA	14±1	10±1	48±1	37±1	3.4×10^6	3.7×10^6
GTP	29±2	23±2	41±0.7	31±0.5	1.4×10^6	1.3×10^6

Esto sugiere que las diferencias observadas en las enzimas porcinas no dependen exclusivamente del aminoácido localizado en la posición 139, sino que dependen de la interacción de éste con alguna otra región de la proteína en la cual habría diferencias de secuencia entre la proteína porcina y la de rata. Para investigar esta posibilidad, se intentó caracterizar y cristalizar una quimera cerdo-rata de Pck1. Para ello se diseñó una

construcción que expresó en *E. coli* una Pck1 quimérica compuesta por los primeros 259 residuos de la Pck1 porcina y los aminoácidos 260-622 de la homóloga en rata (N-(1-259)-cerdo/C-(260-622)-rata). Aunque las enzimas resultantes eran perfectamente activas, no hubo diferencias entre la que portó metionina y la que presentó leucina en posición 139 (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Propiedades cinéticas de Pck1 salvaje y la variante p.M139L en la quimera cerdo-rata.						
Sustrato	K_m (μM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	
	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L
PEP	464±135	489±111	21±1.5	17±1	4.5×10^4	3.5×10^4
KHCO ₃	10546±1077	8655±1127	20±0.8	19±0.6	1.9×10^3	2.2×10^3
GDP	58±12	53±6	16±0.3	17±0.4	2.8×10^5	3.2×10^5
OAA	39±4	42±5	40±1	39±0.6	1×10^6	9.3×10^5
GTP	72±20	90±20	43±0.4	38±0.5	5.9×10^5	4.2×10^5

Estos resultados sugieren que algún aminoácido, o aminoácidos, localizados entre las posiciones 260 y 622 de la proteína porcina, y no presentes en la de rata son necesarios junto con el residuo 139 para producir los cambios funcionales observados en las isoformas de la Pck1 porcina. Puesto que encontrar ese o esos aminoácidos supondría la construcción de un gran número de nuevos mutantes quiméricos, se decidió continuar con otras líneas de investigación.

3.1.6. Efectos de la sobreexpresión de Pck1 en la capacidad gluconeogénica y lipogénica de las células HEK293T

PCK1 es una enzima cuya actividad está relacionada con la gluconeogénesis y la síntesis de lípidos o lipogénesis (Yang et al., 2009a). Para comprobar los efectos de la sustitución M139L en la proteína porcina a nivel fisiológico, se determinó la capacidad de contribuir a estas rutas metabólicas en células HEK293T. En ambos experimentos, las células HEK293T se transfectaron con el plásmido que sobreexpresa Pck1 salvaje o la variante M139L, independientemente. Como control se utilizaron células transfectadas con el plásmido vacío. La utilización de una proteína porcina en células humanas está justificada por el escaso número de líneas celulares porcinas disponibles, además que la

línea HEK293T deriva de un tejido gluconeogénico como es el riñón y se caracteriza por su alta eficiencia de transfección, lo que facilita los ensayos.

En los ensayos de producción de glucosa las células transfectadas el día anterior se incubaron en DMEM sin glucosa suplementado con piruvato y lactato de sodio, que estimulan la producción de glucosa en la célula, y se utilizó un ensayo colorimétrico para determinar los niveles de glucosa producida después de 3 horas de incubación en este medio. Como se puede observar en la Figura 3.7, la sobreexpresión de Pck1 salvaje induce una mayor producción de glucosa (30% mayor; 1.32 ± 0.17) con respecto a Pck1 p.M139L (1.01 ± 0.11 ; $n = 4$, $p = 0.0052$). En ambos casos, la producción de glucosa fue superior a la de las células control, transfectadas con el plásmido vacío (0.78 ± 0.07) (Figura 3.7A). La producción de lípidos se determinó suplementando las células con $250 \mu\text{M}$ de palmitato, que es inductor de la adipogénesis, en medio DMEM. Las células se fijaron y se tiñeron con Oil Red-O que se disolvió en isopropanol y se cuantificó espectrofotométricamente. En la Figura 3.7B se puede observar que la inducción con palmitato incrementa los niveles de triglicéridos almacenados en células en, al menos, un 20%. La sobreexpresión de Pck1 salvaje indujo un 9% más de lípidos (1.24 ± 0.07) que la de Pck1 p.M139L (1.13 ± 0.05). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($n = 3$, $p = 0.0125$). Igualmente, la sobreexpresión de cualquiera de las proteínas Pck1 indujo mayor acúmulo de lípidos en las células que las sobreexpresaron que en las que no (1 ± 0.04).

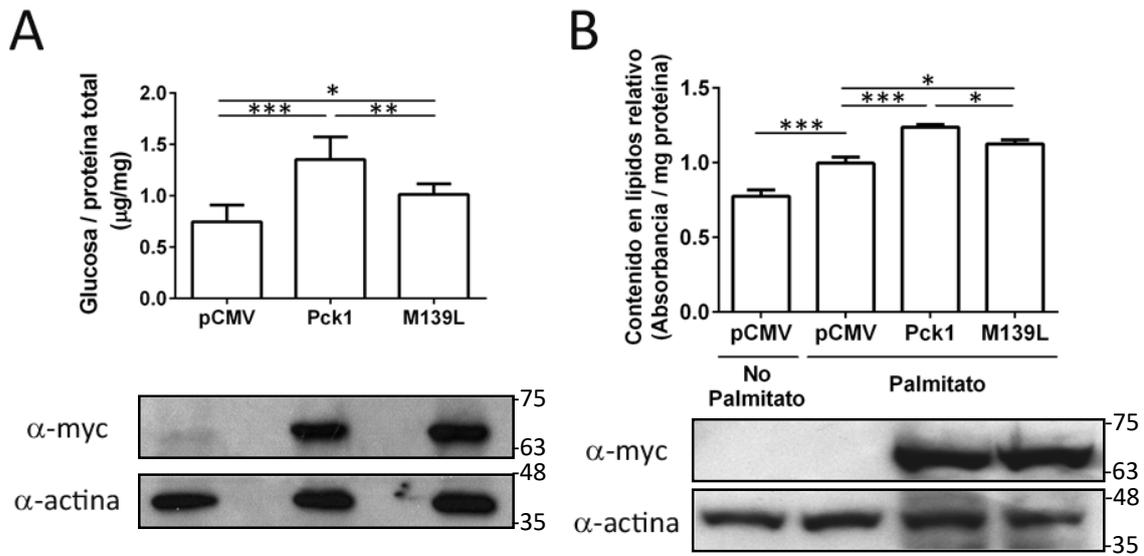


Figura 3.7. Efectos de la sobreexpresión de Pck1 en la capacidad de producción de glucosa y de lípidos en células HEK293T. (A) Producción relativa de glucosa en células control transfectadas con pCMV-myc (pCMV; 0.78 ± 0.13 µg/mg proteína total) y aquellas que sobreexpresan Pck1 salvaje (Pck1; 1.32 ± 0.17 µg/mg proteína total) o Pck1 p.M139L (M139L; 1.01 ± 0.11 µg/mg proteína total) en DMEM sin glucosa suplementado con piruvato y lactato de sodio. El test ANOVA ($n=4$) indica diferencias entre grupos ($p=0.000128$). Se realizó un test post-hoc de Tukey para determinar diferencias entre las parejas de grupos (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). **(B)** Producción relativa de lípidos en células HEK293T control transfectadas con el plásmido pCMV-myc no tratadas (0.78 ± 0.07) o tratadas con palmitato (1 ± 0.04) y en aquellas que sobreexpresan Pck1 salvaje (Pck1; 1.24 ± 0.07) o Pck1 p.M139L (M139L; 1.13 ± 0.05) en presencia de palmitato. El contenido en lípidos se determinó por medio de la tinción Oil Red-O y normalizó al contenido en proteína. El test ANOVA ($n=3$) indica diferencias entre grupos ($p=2.16 \times 10^{-6}$). El test de Tukey se usó para determinar las diferencias entre las parejas de grupos (* $p<0.05$, *** $p<0.001$). En ambos casos se realizó un western blot para comprobar una sobreexpresión semejante de ambas isoformas, cuyos resultados se muestran debajo de cada gráfica, con cada carril alineado con su correspondiente muestra en la gráfica. α -myc (Pck1) = anti-myc, α -actina = anti-actina, usado como control de carga. La normalidad de los datos se determinó con el test Shapiro-Wilk. Los números a la derecha de los blots representan el peso molecular (kDa).

3.1.7. Nivel de acetilación de Pck1 y Pck1 p.M139L en células HEK293T

La acetilación se ha mostrado como una de las principales modificaciones post-traduccionales de PCK1 (Zhao et al., 2010). Por ello, se analizaron posibles diferencias en el nivel de acetilación entre Pck1 y Pck1 p.M139L por medio de inmunoprecipitaciones contra el antígeno acetil-lisina y western blot. Como puede observarse en la Figura 3.8A, el nivel de acetilación de Pck1 p.M139L es un 32% superior al de Pck1 salvaje. Se observó que el residuo 139 se encuentra muy próximo a la lisina 14. Dado que la acetilación se produce generalmente en lisinas, se barajó la posibilidad

de que esta lisina fuese acetilada. Así, se realizó el mismo experimento de determinación del nivel de acetilación incluyendo la mutación K14A tanto en la enzima salvaje como en la variante p.M139L. Como puede apreciarse, la diferencia entre Pck1 salvaje y la variante p.M139L desaparece cuando la lisina 14 es sustituida por alanina (Figura 3.8).

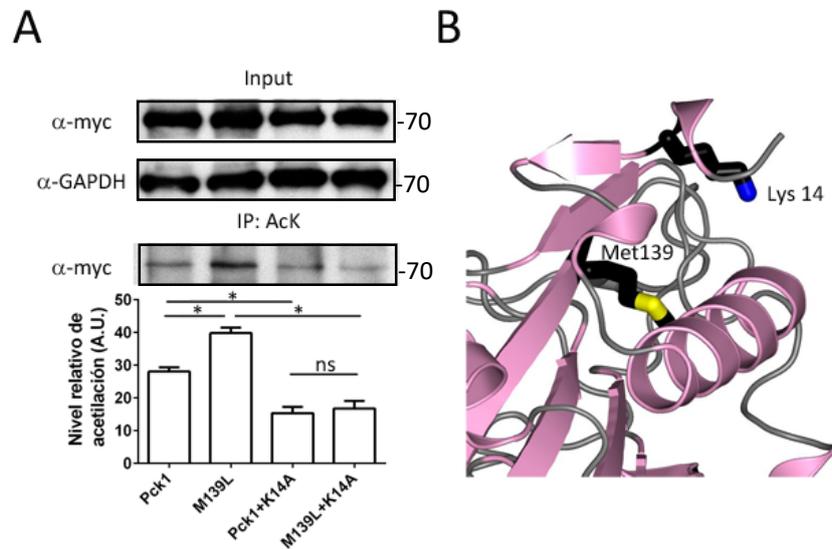


Figura 3.8. Nivel de acetilación de Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas en células HEK293T. (A) El nivel de acetilación se determinó por medio de inmunoprecipitaciones (IP). Las células transfectadas con cada una de las construcciones se lisaron y 40 μ g de cada muestra se incubaron en presencia de 1 μ g de anticuerpo anti-acetil-lisina (AcK). Pck1 (myc) se detectó por western blot y las bandas se cuantificaron utilizando ImageJ (NIH). GAPDH se utilizó como control de carga. En el panel inferior se observa un gráfico de barras que representa la media y desviación estándar de 6 experimentos independientes. Estos datos no siguieron una distribución normal y las diferencias entre grupos se analizaron por medio de un test de Kruskal-Wallis ($n=6$, $p=1.38 \times 10^{-15}$). Las diferencias entre parejas de grupos se determinaron por medio de un test de Wilcoxon (ns= no significativo, * $p < 0.05$). A.U. = Unidades arbitrarias; Pck1 = Pck1 salvaje; M139L = Pck1 p.M139L. **(B)** Estructura de la PCK1 humana (PDB 1KHF) mostrando la región cercana al aminoácido 139 (Met139) que está a 8.9 Å de la lisina 14 (Lys14). Los números a la derecha de los blots representan el peso molecular (kDa).

Estos resultados indican que la sustitución en la variante M139L puede hacer de Pck1 un mejor sustrato para ser acetilada como consecuencia de un cambio de estructura en los alrededores de este residuo.

3.1.8. Estabilidad de Pck1 y Pck1 p.M139L en células HEK293T

Tal y como se señaló anteriormente (véase 1.6.4.2, página 38), se ha observado que la acetilación de PCK1 está relacionada con su degradación (Jiang et al., 2011). Para comprobar este fenómeno, se decidió determinar la estabilidad de Pck1 y Pck1 p.M139L

en células HEK293T. Para ello, las células transfectadas se trataron con cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteína, durante 24 horas. La presencia de Pck1 se determinó por medio de western blot y se utilizó actina como control de carga. Como puede apreciarse en la Figura 3.9, tras 24 horas, la cantidad de Pck1 aún presente fue un 19% mayor ($81\pm 4.8\%$) que la de Pck1 p.M139L ($63\pm 5.5\%$). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($n=3$, $p=0.013$). En paralelo, la sustitución K14A, que impide la acetilación en esa posición, hizo que los niveles de Pck1 se mantuviesen prácticamente invariables.

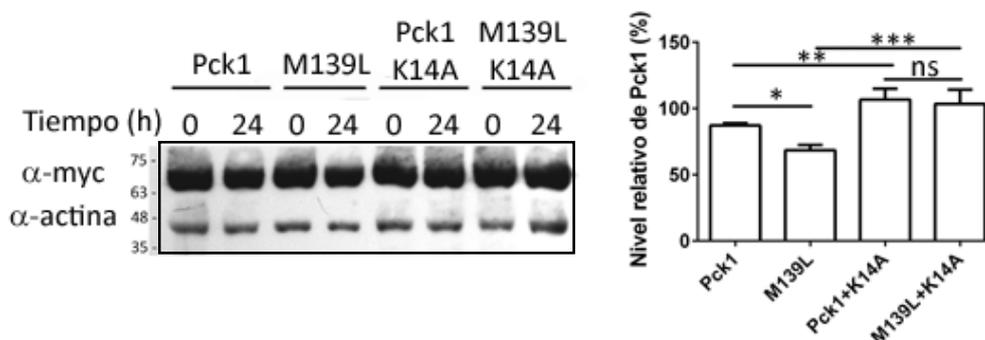


Figura 3.9. Estabilidad de Pck1 y Pck1 p.M139L en células HEK293T. Células que sobreexpresaban Pck1, Pck1 p.M139L o las variantes que incluyen la sustitución K14A se trataron con cicloheximida (CHX, 100 μ g/mL) durante 24 horas. Pck1 (myc) se detectó por western blot. El western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes. Los números a la izquierda representan el peso molecular. Las bandas se analizaron utilizando ImageJ, normalizando al contenido de actina, y sus intensidades aparecen representadas en el gráfico de la derecha que muestra la media y la desviación estándar de la cantidad de proteína presente tras el tratamiento con CHX con respecto al tiempo cero. Las diferencias entre grupos resultaron significativas (ANOVA, $n=3$, $p=0.000685$. Pck1 = Pck1 salvaje; M139L = Pck1 p.M139L; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ns = no significativo).

Estos resultados indican que la sustitución M139L disminuye la estabilidad de la proteína e incrementa su susceptibilidad a ser acetilada.

3.1.9. Frecuencias alélicas de Pck1 en distintas razas y cruces porcinos

La mejora genética exige la existencia de variabilidad en los genes de dicha población. Por ello se decidió determinar la frecuencia del alelo C del polimorfismo de Pck1. Por medio del ensayo de discriminación alélica (RT-PCR) se analizó el impacto de la

sustitución c.A2456C del gen *Pck1* en distintas razas o cruces. En la Tabla 3.6 se puede observar que la frecuencia del alelo C, el que codifica leucina, está ampliamente extendido en cruces industriales que han sido sometidos a una fuerte presión de selección y cuya carne es más magra. En el caso contrario, en los cerdos de raza ibérica, Duroc 1 (una población Duroc poco seleccionada) y jabalís el alelo A está más presente. En todos casos hubo variabilidad, que es esencial en selección.

Tabla 3.6. Distribución alélica de la sustitución c.A2456C en distintas razas y cruces.				
Raza/Cruce	Genotipo			p¹
	AA	AC	CC	
Jabalí	10	3	0	0.12
Ibérico	18	8	0	0.15
Duroc 1	18	8	1	0.19
Duroc 2	17	42	16	0.41
Duroc x Landrace-Large White	73	114	15	0.36
Piètrain x Large White	12	68	53	0.65
Piètrain	2	26	21	0.69

¹p = frecuencia del alelo C.

3.2. Efectos de la variante porcina p.C430S de Pgc1 α sobre la actividad

PCK1

La mejora genética raramente se basa en un único marcador. Esto sólo es posible con genes mayores ya que como se indicó anteriormente (véase 1.4, página 23), el fenotipo en la mayoría de caracteres es el resultado de la acción de unos pocos o de cientos o miles de genes. Aunque la selección de un único marcador no tiene en general sentido productivo, el estudio de los mecanismos por los que actúan los polimorfismos permite conocer mejor la génesis de los caracteres cuantitativos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado 3.1 (página 103), se decidió continuar el estudio de los efectos de polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo y con la PCK1. Como se ha dicho, la PCK1 es una enzima fuertemente regulada a nivel transcripcional y PGC1 α es un regulador transcripcional que actúa sobre el promotor de PCK1 a través de diversos activadores transcripcionales como PPAR γ . La existencia de polimorfismos conocidos en el gen de *Pgc1 α* porcino llevó al estudio de los efectos de uno de ellos, el primero en descubrirse y sobre el que se han publicado diversos estudios. Sin embargo, los efectos de esta sustitución sobre el fenotipo han mostrado resultados variables en función de la población analizada (Erkens et al., 2010; Kunej et al., 2005; Liu et al., 2011). Por ello, se trabajó con el polimorfismo c.T1378A de *Pgc1 α* y su posible interacción con el c.A2456C de *Pck1*.

3.2.1. Efectos de la variante p.C430S en los niveles endógenos de PCK1

PGC1 α es un regulador transcripcional capaz de inducir la expresión de PCK1 a través de intermediarios (Finck and Kelly, 2006; Tontonoz et al., 1995). Tal y como se observa en la Figura 3.10A, la cisteína 430 está conservada entre distintas especies. Para comprobar si la sustitución p.C430S tenía efectos sobre la capacidad de inducir la expresión de PCK1, se determinaron los niveles endógenos del mRNA que codifica esta proteína en células HEK293T transfectadas con cada una de las variantes de *Pgc1 α* y se compararon con el nivel de las células control, transfectadas con el plásmido vacío. En la Figura 3.10B se

puede observar que Pgc1 α es capaz de inducir 2.4 veces más expresión de PCK1 que la variante p.C430S. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (n = 3, p = 0.0002). Igualmente, la sobreexpresión de cualquiera de las variantes de Pgc1 α incrementó sustancialmente los niveles de mRNA de PCK1 con respecto a las células control.

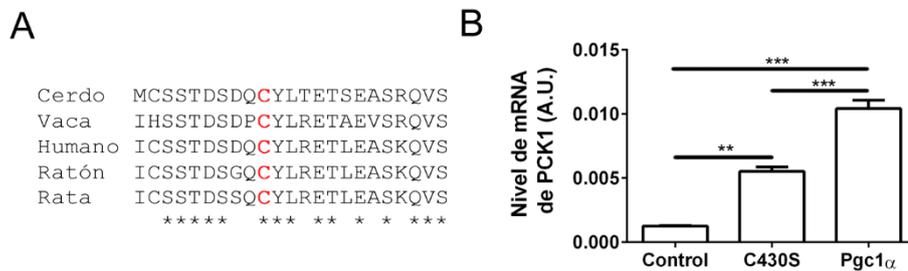


Figura 3.10. Efecto de la sustitución p.C430S sobre los niveles de expresión de PCK1 endógena en células HEK293T. (A) Alineamiento de la región comprendida entre los residuos 421 y 443 de Pgc1 α porcina. En rojo se resalta la cisteína 430 que aparece conservada en diversas especies mamíferas. Los asteriscos indican residuos conservados. Las secuencias alineadas fueron tomadas de GenBank: NP_999128.2 (cerdo), Q865B7 (vaca), Q9UBK2.1 (humano), NP_032930.1 (ratón) y Q9QYK2.1 (rata). **(B)** Niveles endógenos de mRNA de PCK1 en células control (Control) y en aquellas que sobreexpresan o Pgc1 α (Pgc1 α) o bien la variante Pgc1 α p.C430S (C430S). En el gráfico se representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por medio de un test ANOVA (n=3; p= 1.3x10⁻⁵) y las diferencias entre grupos se determinaron por medio de un test post-hoc de Tukey. ** p<0.01, ***p<0.001. A.U. = Unidades arbitrarias.

Para comprobar los efectos del incremento en los niveles de mRNA sobre la expresión de proteína, se determinaron los niveles de PCK1 por medio de western blot. Como se puede apreciar en la Figura 3.11A, la sobreexpresión de Pgc1 α incrementó los niveles de PCK1, aunque sólo en un 20%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (n = 3, p = 0.0191). Un resultado muy parecido se observó en los niveles de PCK1 en células HepG2 (Figura 3.11B). Sin embargo, no se apreció ninguna diferencia significativa en los niveles de PCK1 cuando se sobreexpresó Pgc1 α p.C430S.

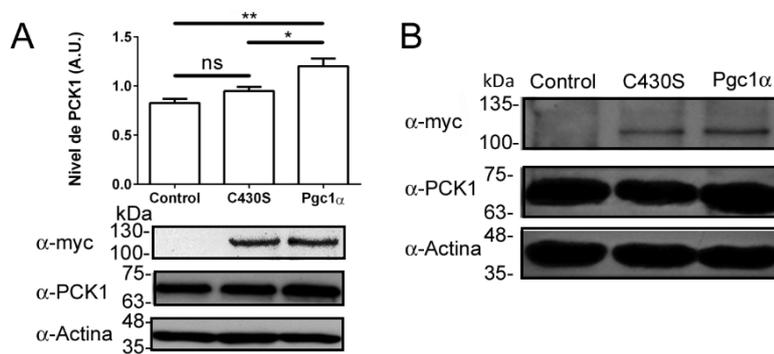


Figura 3.11. Efecto de la sobreexpresión de Pgc1 α y la variante p.C430S en los niveles de PCK1 endógena en células HEK293T y HepG2. (A) Determinación de los niveles de PCK1 en células HEK293T control y en células sobreexpresando una de las dos variantes de Pgc1 α (myc). Los niveles de PCK1 endógena fueron cuantificados utilizando ImageJ y normalizados al contenido de actina. El gráfico representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias se analizaron por medio de un test ANOVA ($n=3$, $p=0.0027$) y un test post-hoc de Tukey. **(B)** El mismo experimento que en (A) se repitió en células HepG2. α -myc = anti-myc, α -PCK1 = anti-PCK1, α -Actina = anti-actina. Control = células control, Pgc1 α = Pgc1 α salvaje, C430S = Pgc1 α p.C430S. Los números a la izquierda de los western blots representan el peso molecular de marcadores corridos en paralelo (kDa).

3.2.2. Efectos de la sobreexpresión de las variantes de Pgc1 α sobre la capacidad gluconeogénica de las células HEK293T

Para determinar si la diferencia de actividad transcripcional de Pgc1 α tenía alguna consecuencia sobre la actividad metabólica de la célula, se determinó la capacidad gluconeogénica de las células HEK293T cuando sobreexpresaron cada una de las variantes de Pgc1 α y se comparó con la cantidad de glucosa producida por las células control que no sobreexpresaron Pgc1 α (Figura 3.12).

Como se puede apreciar en la Figura 3.12, las células que sobreexpresaron cualquiera de las variantes de Pgc1 α produjeron más glucosa (10-12 veces) que las células control. Sin embargo, Pgc1 α p.C430S produjo un 19% menos de glucosa que la variante salvaje, lo que indicó que el cambio en la actividad transcripcional de la variante p.C430S de Pgc1 α tenía consecuencias sobre el metabolismo celular.

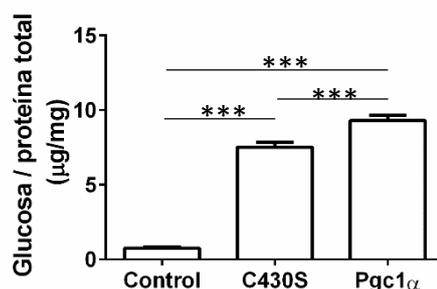


Figura 3.12. Efecto de la sobreexpresión de cada variante de Pgc1 α en la capacidad gluconeogénica de las células HEK293T. Producción relativa de glucosa en células control transfectadas con pEGFP-N1 (Control; 0.64±0.03) y aquellas que sobreexpresan Pgc1 α salvaje (Pgc1 α ; 9.3±0.3 µg/mg proteína total) o Pgc1 α p.C430S (C430S; 7.5±0.3 µg/mg proteína total) en DMEM sin glucosa suplementado con piruvato y lactato de sodio. El contenido en glucosa se determinó por medio de un ensayo colorimétrico midiendo la absorbancia del producto de la reacción a 540 nm. El test ANOVA indica diferencias entre grupos (n=3, p=3.3x10⁻⁸). Se realizó un test post-hoc de Tukey para determinar diferencias entre las parejas de grupos (***) p<0.001). Las células se transfectaron en paralelo junto con las obtenidas en el experimento de la Figura 3.11A para determinar un nivel de expresión similar de ambas isoformas.

3.2.3. Estabilidad de Pgc1 α y Pgc1 α p.C430S en células HEK293T

Los cambios metabólicos no sólo se deben a modificaciones en la cantidad de proteína, como consecuencia de una mayor o menor expresión, o a cambios de su actividad sino también a su estabilidad en la célula. Por ello, se comparó la estabilidad de ambas variantes de Pgc1 α en células HEK293T por medio de la técnica de western blot, después de añadir cicloheximida al medio. Como se puede observar en la Figura 3.13, en un experimento realizado a lo largo de 60 minutos, los niveles de Pgc1 α salvaje caen hasta un 26.7±10.8 (%) de la cantidad inicial a tiempo cero, mientras que los de Pgc1 α p.C430S descienden hasta un 65.4±7.3 (%) de la cantidad inicial. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (n = 3, p = 0.0095).

3.2.4. Localización subcelular de las variantes de Pgc1 α

PGC1 α es una proteína nuclear, pero se ha descrito que una de las isoformas de PGC1 α generadas por “splicing” alternativo, NT-PGC1 α , se encuentra mayoritariamente en el citosol (Zhang et al., 2009). Por ello, se estudió si la sustitución C430S produjo un cambio

semejante detectando Pgc1 α -GFP en un microscopio de fluorescencia. Los resultados mostraron que ambas proteínas se encontraron en el núcleo (Figura 3.14).

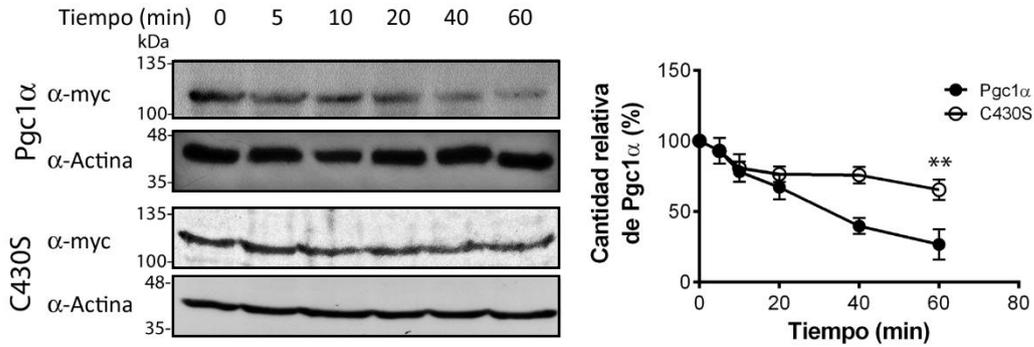


Figura 3.13. Determinación de la estabilidad de las variantes de Pgc1 α en células HEK293T. La síntesis de proteína se inhibió utilizando CHX. Después de 60 minutos se puede apreciar una mayor estabilidad de la variante C430S. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($n=3$, $p=0.0095$). El western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes. El contenido en Pgc1 α (myc) se normalizó al contenido de actina utilizando ImageJ. El gráfico de la derecha representa el porcentaje de proteína restante (media y desviación estándar) a lo largo del tiempo en esos tres experimentos. Pgc1 α = Pgc1 α salvaje, C430S = Pgc1 α p.C430S. ** $p<0.01$.

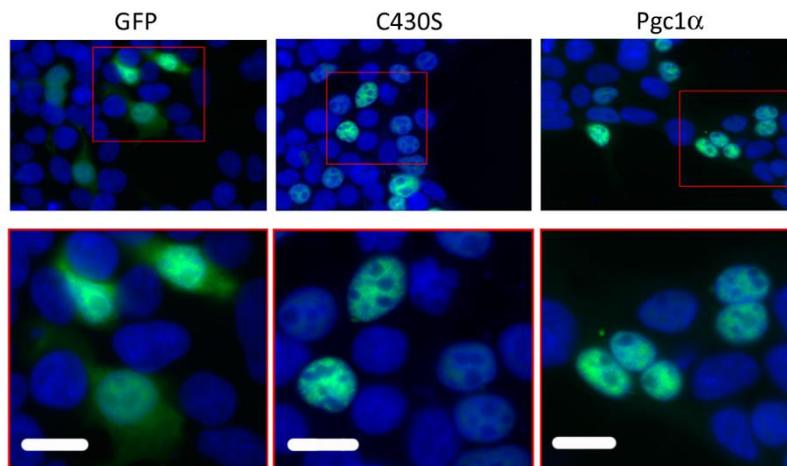


Figura 3.14. Localización subcelular de las variantes de Pgc1 α . Ambas variantes de Pgc1 α se expresaron fusionadas a GFP (verde) en células HEK293T. Los núcleos (azul) se tiñeron previamente con Hoechst 33342. Las imágenes mostradas son superposiciones de los canales azul y verde. Los paneles inferiores son la imagen aumentada del cuadrado rojo señalado en los paneles superiores. Las líneas blancas representan 10 μ m. GFP = células control transfectadas con pEGFP-N1 vacío, C430S = Pgc1 α p.C430S, Pgc1 α = Pgc1 α salvaje.

3.2.5. Efecto de la sustitución p.C430S sobre los niveles de O-glicosilación de Pgc1 α y su interacción con PPAR γ

Los resultados obtenidos mostraron que la mayor estabilidad de la variante p.C430S estaba contrapuesta a su menor capacidad de estimular la síntesis de PCK1. Con el fin de determinar los mecanismos implicados en este fenómeno, se analizaron algunas propiedades de PGC1 α que pudieran explicar la relación entre ésta y PCK1. PGC1 α es un regulador transcripcional cuya actividad está sujeta a diversos tipos de modificaciones post-traduccionales (PTMs) como la fosforilación, la acetilación o la glicosilación (O-GlcNAc). Por tanto, se analizaron posibles diferencias a este nivel entre ambas proteínas. Para ello, se inmunoprecipitaron ambas formas de Pgc1 α y por medio de western blot se analizó el nivel de fosforilación, acetilación y O-glicosilación. Como se observa en la Figura 3.15, no se apreciaron diferencias aparentes en ningún caso. De hecho, no se obtuvo señal para el antígeno O-GlcNAc.

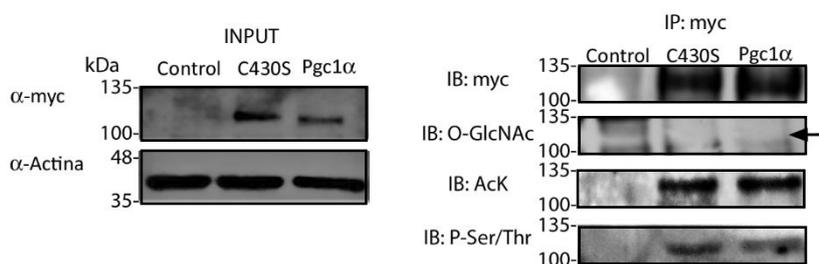


Figura 3.15. Análisis de distintas PTMs en las variantes de Pgc1 α . Células HEK293T sobreexpresaron cada variante de Pgc1 α independientemente. Los lisados celulares se incubaron con anti-myc (α -myc) para inmunoprecipitar Pgc1 α . Después, se estudiaron mediante western blot distintos niveles de PTMs (O-glicosilación -O-GlcNAc-, acetilación de lisinas - AcK- y fosforilación de serinas y treoninas - P-Ser/Thr-). Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa). La flecha indica la posición correspondiente a Pgc1 α . IP = inmunoprecipitación, IB = inmunoblotting.

La O-glicosilación de PGC1 α garantiza su estabilidad en la célula (Ruan et al., 2012). Puesto que no se detectó la proteína glicosilada en condiciones normales, para estudiar los niveles de O-glicosilación se siguieron dos enfoques. Por un lado, se cotransfectaron cada una de las variantes de Pgc1 α con la subunidad de 72 kDa de la O-GT humana (la enzima que cataliza la reacción de glicosilación O-GlcNAc) y, por otro lado, se inhibió la

actividad de O-GlcNAcasas, enzimas que eliminan los grupos O-GlcNAc, en células que sobreexpresaban cada variante de Pgc1 α , suplementando el medio con 100 μ M PUGNAc. Como puede observarse en la Figura 3.16A, la sobreexpresión de O-GT permite detectar los niveles de O-GlcNAc, siendo estos 2 veces mayores en el caso de Pgc1 α p.C430S. Esta diferencia fue significativa (n = 3, p = 0.0052). La inhibición de O-GlcNAcasas produjo un efecto semejante, detectando mayor glicosilación O-GlcNAc en esta variante (Figura 3.16B). Dado el papel de PGC1 α para estimular la expresión de PCK1 a través de PPAR γ (Glorian et al., 2001; Tontonoz et al., 1995), se analizó la presencia de este activador transcripcional en los inmunoprecipitados de Pgc1 α , detectándose un menor nivel en el caso de la variante Pgc1 α p.C430S (Figura 3.16A).

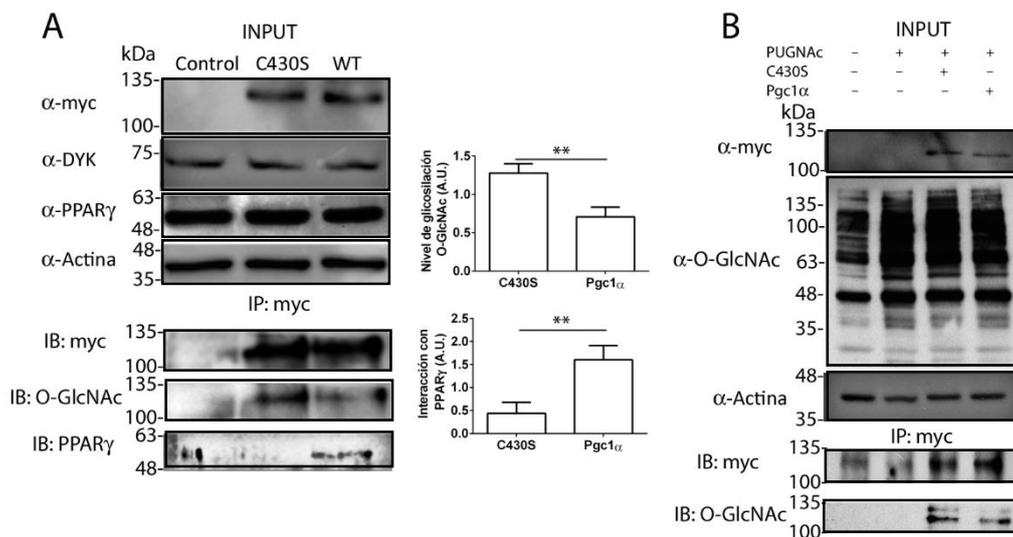


Figura 3.16. Nivel de O-glicosilación de las variantes de Pgc1 α y su interacción con PPAR γ . (A) Las células HEK293T se co-transfectaron con O-GT marcada con el epítipo DYK (α -DYK) y una de las variantes de Pgc1 α (myc). Los niveles de O-GlcNAc y PPAR γ endógena se cuantificaron utilizando ImageJ normalizando al contenido en Pgc1 α . (B) Experimento semejante al descrito en (A) pero, en este caso, no se cotransfectó O-GT y se añadió PUGNAc 16 horas antes de recoger las células. Este ensayo se llevó a cabo una vez con tres réplicas técnicas.

3.2.6. Efecto epistático entre los genes *Pgc1 α* y *Pck1* porcinos

Al igual que se estudiaron los efectos de la sustitución c.A2456C del gen Pck1 porcino sobre los caracteres fenotípicos en un cruce de una población porcina Duroc x Landrace/Largewhite (3.1.2), se decidió estudiar el efecto de la sustitución c.T1378A de

Pgc1 α , que produce el cambio de aminoácido Cys430Ser en la proteína. En primer lugar, se genotipó la población siguiendo un método ya descrito (Kunej et al., 2005). Las frecuencias genotípicas para el polimorfismo c.T1378A fueron 29.8% AA, 56.1% AT y 14.1% TT. Mediante un método de análisis Bayesiano se estudiaron los efectos de esa sustitución sobre los caracteres fenotípicos en la población de interés. Como en el apartado 3.1 (página 103), se consideraron relevantes las distribuciones posteriores superiores a 0.9 o inferiores a 0.1. En la Tabla 3.7 se puede observar que los efectos de la sustitución de *Pgc1 α* sobre la población porcina son relevantes para un único carácter (porcentaje de solomillo), indicando que, en la población estudiada, la sustitución no tiene efecto directo.

Teniendo en cuenta la estrecha relación de *PGC1 α* con *PCK1*, se valoró la posibilidad de un efecto epistático entre ambos genes. Este análisis reveló interacciones de tipo aditivo en el 60 % (11 de 19) de los caracteres estudiados. Además, los resultados mostraron cierta coherencia: las tres medidas de exudación siguieron la misma tendencia, incrementándose en la combinación de alelos *Pck1* (C) y *Pgc1 α* (A). Sin embargo, esta misma combinación disminuyó el contenido en tejido adiposo en cuatro localizaciones (tocino dorsal, panceta, tocino y tejido adiposo en jamón).

En la Figura 3.17 se representa gráficamente el efecto epistático entre *Pgc1 α* y *Pck1* para los caracteres contenido de jamón y tocino dorsal. En las gráficas se representa el fenotipo en función del genotipo de *Pck1* (eje de abscisas) y de *Pgc1 α* (puntos unidos por una misma línea). En ambos casos, las líneas trazadas no son paralelas indicando un efecto epistático aditivo asociado con *Pgc1 α* para los genotipos AA y AC del locus *Pck1* que desaparece (tocino dorsal) o disminuye (contenido en jamón) en los individuos con genotipo CC.

Tabla 3.7. Estimación de la media posterior y probabilidad Bayesiana posterior de los efectos aditivo y epistático aditivo x aditivo entre *Pgc1α* c.T1378A y *Pck1* c.A2456C.

Carácter	Media (SD)	Efecto aditivo (A ₁)	P	Efecto aditivo (A ₂)	P	Efecto epistático (A ₁ xA ₂)	P		
Tocino dorsal	19.85 (5.78)	0.014 (0.010)	0.085	0.873 (0.582)	0.067	-1.626 (0.744)	0.986		
Lomo (%)	5.73 (0.67)								
Solomillo (%)	0.77 (0.10)								
Jamón (%)	25.86 (1.27)						0.396 (0.179)	0.013	
Paleta (%)	15.18 (0.79)					-0.176 (0.089)	0.976	0.247 (0.118)	0.018
Panceta (%)	6.63 (1.23)							-0.337 (0.172)	0.975
Tocino (%)	12.23 (1.86)							-0.486 (0.291)	0.953
Costillas (%)	6.77 (0.90)							-0.353 (0.146)	0.992
Grasa subcutánea (%)	19.17 (3.64)							-0.826 (0.542)	0.936
Músculo total en jamón (%)	64.96 (3.55)					-0.541 (0.383)	0.921		
Huesos en jamón (%)	15.86 (1.99)								
pH _{24h}	5.64 (0.15)								
pH _{45min}	6.34 (0.23)								
Color L	50.46 (2.98)								
Color a	6.44 (1.26)								
Color b	1.54 (0.76)							0.209 (0.127)	0.050
Exudación después de 1 día	4.27 (1.91)			0.486 (0.214)	0.012	0.603 (0.277)	0.015		
Exudación después de 3 días	6.56 (2.38)			0.754 (0.286)	0.004	0.633 (0.351)	0.036		
Exudación después de 7 días	8.10 (2.49)			0.770 (0.303)	0.006	0.900 (0.409)	0.014		

SD = Desviación estándar; P = Probabilidad Bayesiana por encima de cero; A₁ = Efecto aditivo de *Pgc1α* y A₂ = Efecto aditivo de *Pck1*. Sólo aquellos resultados cuya P está por encima de 0.9 o por debajo de 0.1 aparecen representados.

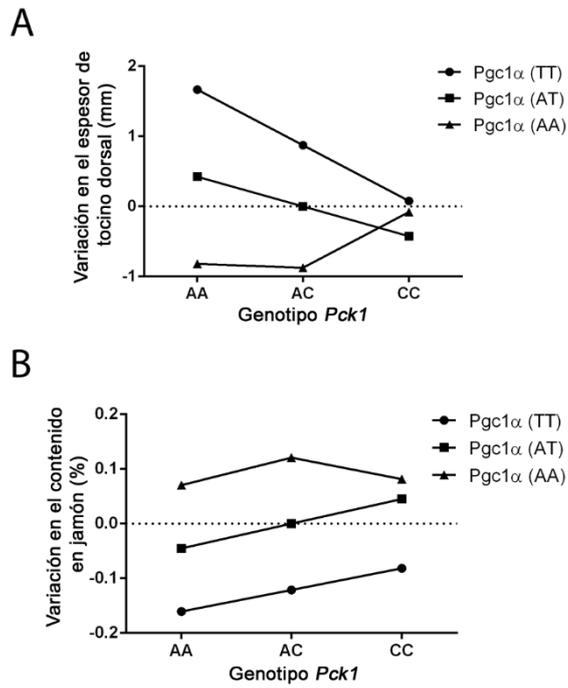


Figura 3.17. Epistasia entre los polimorfismos *Pgc1α* c.T1378A y *Pck1* c.A2456C. Representación gráfica de los efectos epistáticos obtenidos en la Tabla 3.7 para los caracteres contenido en tocino dorsal (A) y contenido en jamón (B). En ambos casos, el efecto aditivo del locus *Pgc1α* es mayor en presencia del genotipo *Pck1*_{AA}, mientras que este efecto desaparece (tocino dorsal) o disminuye (contenido en jamón) en los individuos con genotipo *Pck1*_{CC}.

3.3. Efectos de la acetilación sobre la actividad de PCK1

La acetilación es una de las modificaciones post-traduccionales de Pck1. Tal y como se vio anteriormente (véase 3.1.7, página 114), la variante p.M139L mostró un mayor nivel de acetilación. Algunos autores han indicado que la acetilación directa por parte de p300 es una señal de degradación de PCK1 (Jiang et al., 2011). Sin embargo, el nivel de acetilación observado (Figura 3.8) no se correspondió con el mismo nivel de degradación (Figura 3.9) y los estudios preliminares a esta parte del trabajo indicaron que la presencia de p300 no era capaz de modificar los niveles de Pck1 sobreexpresada en células HEK293T. Además, en levaduras se ha observado que la acetilación modifica las propiedades cinéticas de Pck1p (Lin et al., 2009). Inicialmente, se planteó estudiar el papel de la acetilación y deacetilación de las variantes porcinas Pck1 y Pck1 p.M139L en el laboratorio del Dr. Denu (UW-Madison, EEUU). Sin embargo, debido a la gran cantidad de datos cinéticos, estructurales y la facilidad de purificación a partir de *E. coli*, se trabajó con la Pck1 de rata (*Rattus norvegicus*) y además se decidieron estudiar con más claridad los mecanismos de acetilación y deacetilación por dos motivos: 1) La p300 lleva a cabo su función acetil-transferasa en el núcleo (Sebti et al., 2014; Shi et al., 2009) y 2) la deacetilación *in vitro* de proteínas plegadas, como PCK1, por parte de sirtuinas plantea dificultades (Knyphausen et al., 2016). Todo ello llevó al estudio de los mecanismos de acetilación y deacetilación de PCK1 y su influencia en la actividad de la enzima y a considerar la posibilidad de que la acetilación pudiera tener una función biológica más allá de la mera degradación de PCK1.

3.3.1. Niveles de PCK1 endógena en células gluconeogénicas

Aunque la PCK1 es un enzima gluconeogénico (Yang et al., 2009a), en determinados estudios se ha visto que podría tener otro papel en el metabolismo (Burgess et al., 2007; She et al., 2000, 2003). El mRNA de PCK1 tiene una vida media relativamente corta (20 minutos) (Tilghman et al., 1974) y la insulina (Yang et al., 2009b) reprime su transcripción en condiciones de alta glucosa (Shao et al., 2005). Sin embargo, en tejidos de rata, la vida medida de la proteína PCK1 es larga, unas 20 horas durante el ayuno y entre 6 y 8

tras la ingesta de alimento (Hopgood et al., 1973) y en algunos casos no se ha visto degradación de la misma durante más de 24 horas (Philippidis et al., 1972). Otros autores han observado que la acetilación regula la estabilidad de PCK1 (Jiang et al., 2011). Con el fin de investigar estas discrepancias, estudiamos los niveles endógenos de PCK1 y también los de p300, SIRT1 y SIRT2 en células HEK293T expuestas a distintas condiciones de glucosa. Después de 24 horas, los niveles de PCK1 se mantuvieron constantes mientras que los de SIRT1 y SIRT2 descendieron y los de p300 aumentaron en condiciones de alta concentración de glucosa (Figura 3.18).

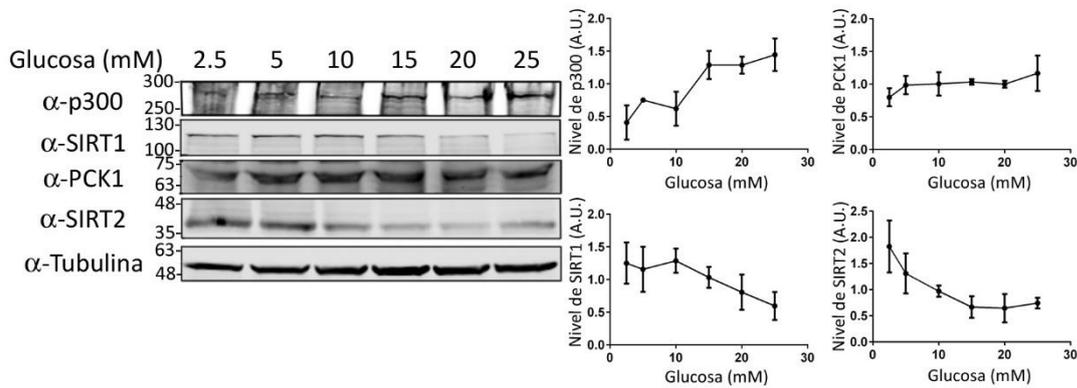


Figura 3.18. Niveles endógenos de distintas proteínas en células HEK293T. Las células HEK293T fueron expuestas a distintas concentraciones de glucosa durante 24 horas antes de ser recogidas y lisadas. Por medio de western blot se detectaron p300 (α -p300), SIRT1 (α -SIRT1), PCK1 (α -PCK1) y SIRT2 (α -SIRT2). Como control de carga se utilizó tubulina (α -Tubulina). El western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes. Los números a la izquierda de los blots representan el peso molecular (kDa). Las bandas se analizaron utilizando ImageJ y los niveles relativos al contenido en tubulina se representan en los gráficos de la derecha. A.U. = Unidades arbitrarias.

De manera semejante se determinaron los niveles de PCK1 endógena en células HepG2 los cuales se mantuvieron constantes independientemente de la concentración de glucosa (Figura 3.19), igual que sucedió en células HEK293T (Figura 3.18).

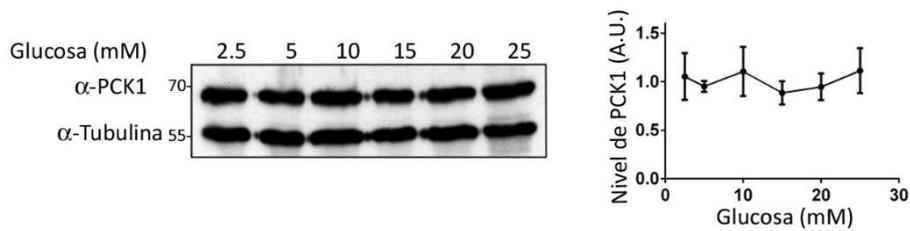


Figura 3.19. Niveles de PCK1 en células HepG2. Se determinaron los niveles de PCK1 en células HepG2 en un experimento semejante al descrito en la Figura 3.18. Los niveles de PCK1 fueron constantes. El western blot es representativo de cuatro experimentos independientes. Los números a la izquierda representan el peso molecular. A.U. = Unidades arbitrarias.

Estos mismos experimentos se repitieron en las mismas condiciones, pero suplementando a los medios preparados a distintas concentraciones de glucosa con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Los niveles de PCK1 se mantuvieron igualmente constantes, excluyendo que el suero fetal bovino fuese, por ausencia o presencia, responsable de la estabilidad de PCK1 (Figura 3.20).

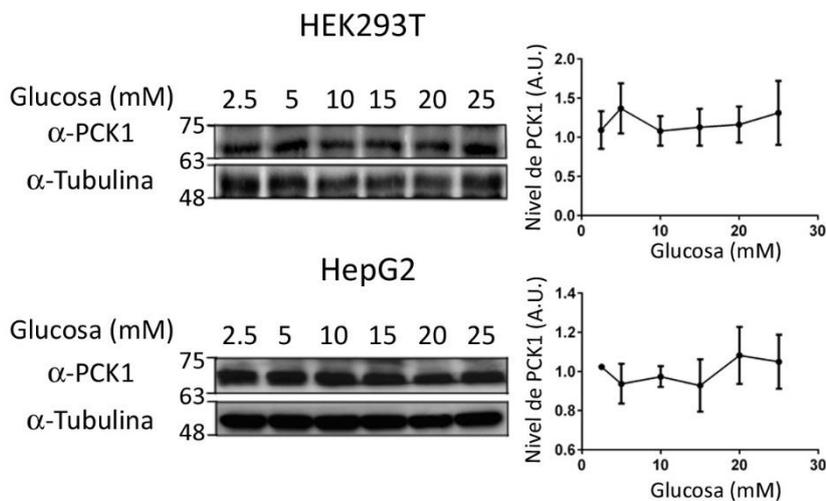


Figura 3.20. Niveles de PCK1 endógena en presencia de suero fetal bovino en células HEK293T y HepG2. Se realizó un experimento semejante al de la Figura 3.18 y Figura 3.19 pero incluyendo en todas las condiciones suero fetal bovino a una concentración final del 10%. Los blots son representativos de dos experimentos independientes. Los números a la izquierda representan el peso molecular (kDa). A.U. = Unidades arbitrarias.

3.3.2. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad Pck1

Se ha observado que PCK1 es acetilada de un modo dependiente de glucosa (Zhao et al., 2010) de tal modo que cuanto mayores son los niveles de glucosa, mayor es el nivel de acetilación. Una vez comprobado que los niveles de PCK1 se mantienen constantes independientemente de la concentración de glucosa, se consideró la posibilidad de que la actividad de PCK1 se modificase como consecuencia de un cambio en el nivel de acetilación. Para ello, se purificó la fracción citosólica de células HEK293T y HepG2 expuestas a distintas concentraciones de glucosa. Con ello se midió la actividad de PCK1 endógena en condiciones de velocidad máxima (V_{max}) en ambos sentidos de la reacción. Como se puede observar en la Figura 3.21, altas concentraciones de glucosa disminuyen (un 66% en HEK293T y un 45% en HepG2) la actividad de PCK1 en el sentido gluconeogénico de la reacción. Sin embargo, en el sentido glicolítico, esta actividad se redujo sólo un 33% en células HEK293T y un 20% en células HepG2.

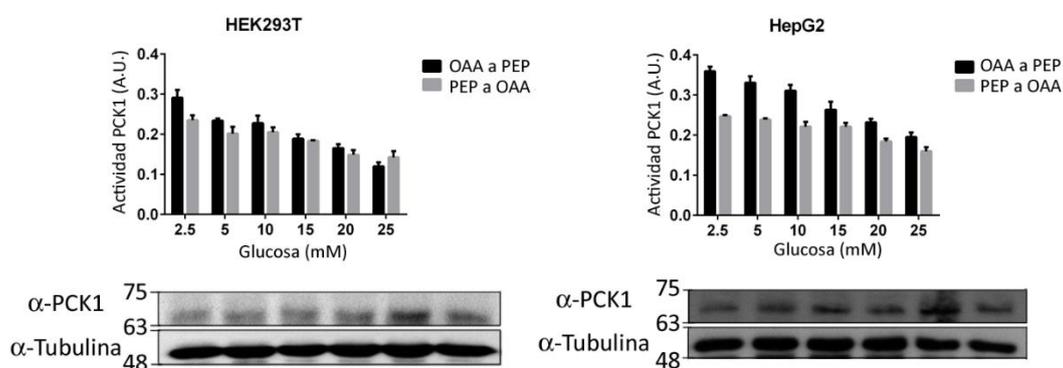


Figura 3.21. Efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad de PCK1 endógena. Se purificaron fracciones citosólicas procedentes de células HEK293T o HepG2 expuestas a distintas concentraciones de glucosa. La actividad PCK1 se midió en los sentidos gluconeogénico (OAA a PEP) y glicolítico (PEP a OAA). El gráfico de barras representa la actividad PCK1 (media \pm desv. estándar) de esas fracciones normalizada al contenido en PCK1 determinado por western blot (paneles inferiores). Se utilizó tubulina (α -Tubulina) como control de carga. Los números a la izquierda representan el peso molecular (kDa). A. U.=Unidades arbitrarias.

A la vista de estos resultados, se llevó a cabo un experimento en el que se sobreexpresó la construcción HA-Pck1-6xHis que codificaba la Pck1 de rata presentando el epítipo HA en el extremo amino y una cola de histidinas en el extremo carboxilo. La facilidad de purificación, la posibilidad de ser cristalizada, la identidad con la proteína humana y la gran cantidad de datos cinéticos y estructuras presentes en la bibliografía justificaron el uso de esta proteína. La Pck1-6xHis se purificó de células HEK293T expuestas a distintas concentraciones de glucosa utilizando resina de níquel-agarosa. En estas condiciones, las concentraciones superiores a 15 mM de glucosa disminuyeron la actividad de Pck1 en un 65% en el sentido gluconeogénico mientras que, en el sentido contrario de la reacción, se vio un descenso no superior al 30%. La actividad de Pck1 fue menor cuando fue purificada de células expuestas a altas concentraciones de glucosa (Figura 3.22A) mientras que a bajas concentraciones de glucosa, la Pck1 se comportó de un modo muy semejante a la proteína recombinante expresada y purificada a partir de bacterias.

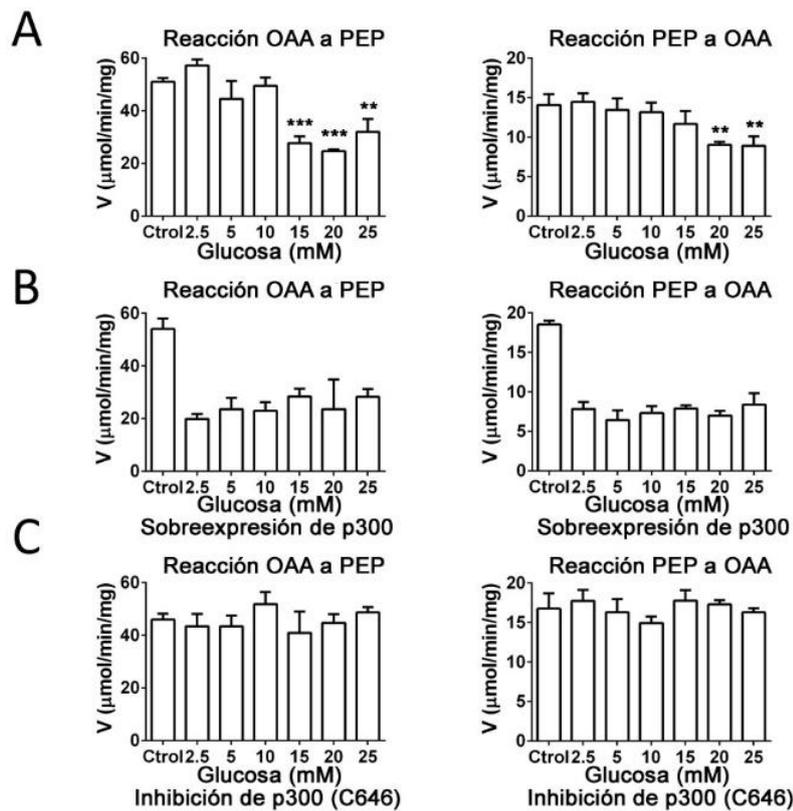


Figura 3.22. Actividad de Pck1 purificada a partir de células HEK293T. (A) Pck1 se sobreexpresó en células HEK293T expuestas a distintas concentraciones de glucosa y se purificó con resina de níquel a partir de los lisados. La actividad se midió en ambos sentidos de la reacción (OAA a PEP y PEP a OAA). La actividad se comparó con la de la misma proteína recombinante purificada a partir de *E. coli* (Ctrl). (B) Experimento semejante al descrito en (A) pero Pck1 se coexpresó conjuntamente con la acetiltransferasa p300. Los gráficos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. (C) Experimento semejante al descrito en (A), pero añadiendo el inhibidor de p300, C646, a una concentración final de 10 µM. En A-C, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los resultados son no significativos si no aparece ningún asterisco.

El experimento descrito en la Figura 3.22A se repitió de manera semejante, pero en esta ocasión cotransfectando las construcciones que expresan Pck1 y p300. El objetivo fue conocer el efecto de la presencia de p300 en células HEK293T que sobreexpresaban Pck1 y que además estaban expuestas a distintas concentraciones de glucosa. En la Figura 3.22B se observa que el efecto de la glucosa sobre la actividad de Pck1 queda neutralizado por la presencia de p300. La actividad de Pck1 cayó un 60%, referida a la Pck1 recombinante obtenida a partir de bacterias, en ambos sentidos de la reacción y no fue determinada por la presencia de una determinada concentración de glucosa. Por otro lado, la inhibición de p300 en células incubadas en DMEM preparado con distintas concentraciones de glucosa en presencia del inhibidor C646, neutralizó el efecto glucosa

rindiendo Pck1 totalmente activa en ambos sentidos de la reacción, sin que se aprecien diferencias entre las distintas condiciones y mostrando un comportamiento semejante a la enzima recombinante de *E. coli* (Figura 3.22C). Estas observaciones indicaron que p300 estaba mediando la pérdida de actividad de Pck1. Tanto p300 (Jiang et al., 2011) como TIP60 (Lin et al., 2009) han sido señaladas como posibles acetil-transferasas de PCK1. A su vez, TIP60 es acetilada y activada por p300 (Xiao et al., 2014). Se decidió entonces purificar el complejo TIP60 a partir de *E. coli* y realizar un experimento de acetilación *in vitro* utilizando Pck1 como sustrato. TIP60 recombinante pudo acetilar su sustrato conocido, la histona H4, pero no fue capaz de hacerlo con Pck1 (Figura 3.23). Con ello, se descartó la posibilidad de que esta proteína acetilase Pck1.

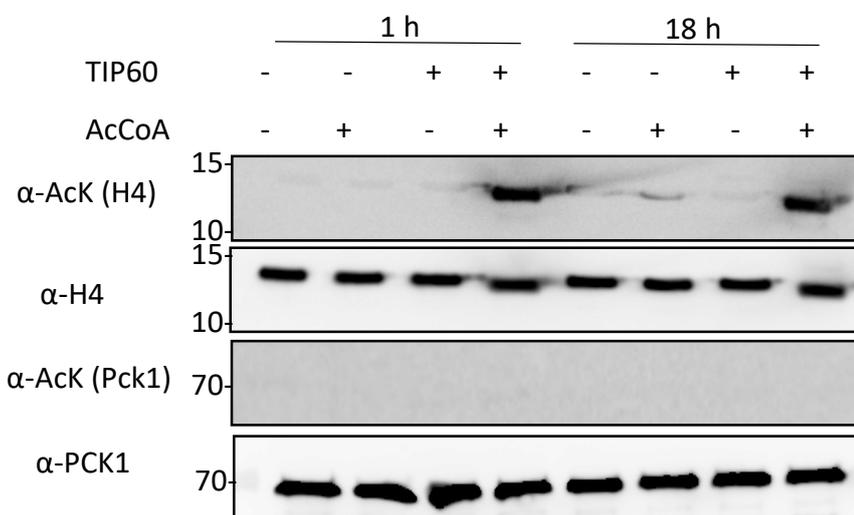


Figura 3.23. Ensayo de acetilación *in vitro* utilizando el complejo TIP60. Pck1 (α -PCK1) y la histona H4 (α -H4) se incubaron independientemente a 25°C durante distintos tiempos y en presencia de acetil-CoA (AcCoA). Por medio de western blot se determinó el nivel de acetilación (α -AcK). Se puede apreciar cierta autoacetilación de la Histona H4 después de una noche de incubación en presencia de acetil-CoA.

Con el fin de conocer si la acetilación era responsable de las diferencias de actividad, la Pck1 purificada a partir de células HEK293T se incubó en presencia de SIRT1 o de SIRT2, ambas proteínas recombinantes, y se midió la actividad de Pck1 en ambos sentidos de la reacción en condiciones de V_{max} . Sólo las muestras incubadas en presencia de SIRT1 recuperaron la mayor parte de la actividad total en ambos sentidos de la reacción. Este

rescate de la actividad de Pck1 fue mayor en aquellas muestras de enzima que provenían de células expuestas a mayores concentraciones de glucosa (15-25 mM). Por el contrario, la incubación con SIRT2 no modificó la actividad de Pck1 (Figura 3.24A y B).

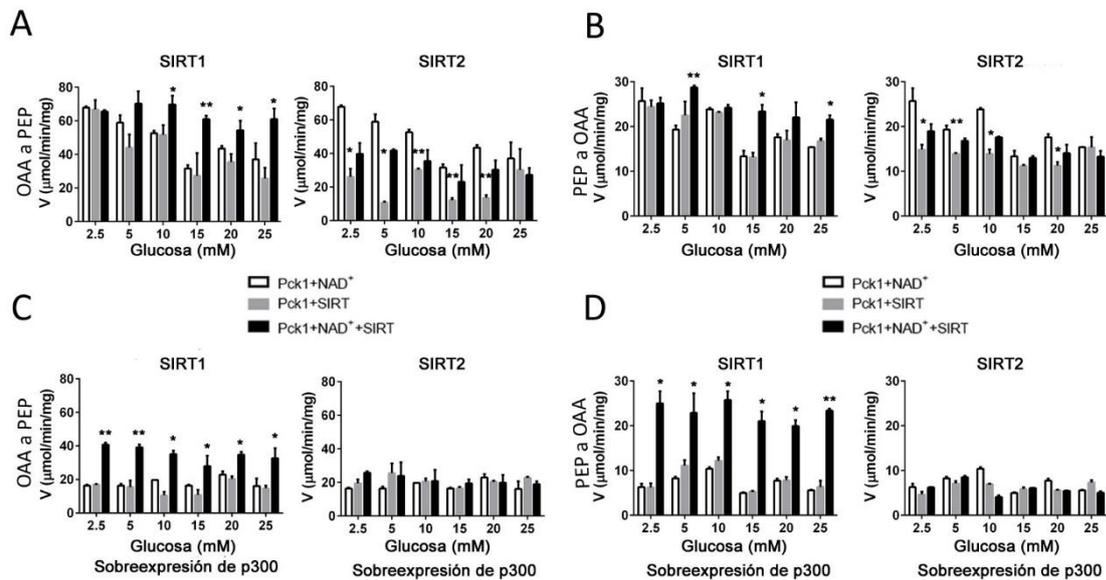


Figura 3.24. Efecto de la incubación de Pck1 con SIRT1 o SIRT2. (A) Pck1 fue incubada en presencia de SIRT1 o SIRT2 y su actividad medida en el sentido gluconeogénico de la reacción. Los gráficos representan la media y desviación estándar de dos experimentos independientes. Como controles se utilizaron Pck1 en presencia de NAD⁺ o Pck1 en presencia de la correspondiente sirtuina. (B) El mismo experimento que (A) pero determinando la actividad en el sentido glicolítico. (C) Mismo experimento que (A) pero utilizando muestras de Pck1 provenientes de células que sobreexpresaron también p300. (D) Mismo experimento que en (B) pero utilizando las muestras descritas en (C). Los ejes se han ajustado a la misma escala para facilitar la comparación. La leyenda indica las distintas condiciones y controles usados. SIRT1 = Tratamiento con SIRT1, SIRT2 = Tratamiento con SIRT2. En A-D, *p<0.05, **p<0.01.

El mismo experimento repetido en muestras provenientes de células que además sobreexpresaron la acetil-transferasa p300 dio el mismo resultado, la incubación con SIRT1 recuperó la actividad Pck1 en ambos sentidos de la reacción (Figura 3.24C y D).

Finalmente, se comprobó el efecto de la presencia de SIRT1 y p300 sobre la actividad gluconeogénica de Pck1 en células. Para ello, se coexpresaron distintas combinaciones de estas tres proteínas y se determinó la capacidad gluconeogénica de las células HEK293T utilizando un medio libre de glucosa. Las células que sobreexpresaron Pck1 tuvieron una mayor actividad gluconeogénica después de 6 horas ($1.6 \pm 0.15 \mu\text{g}/\text{mg}$, n =

3, $p = 0.0045$) que las células control ($0.9 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Figura 3.25), transfectadas con plásmidos vacíos. Sin embargo, la sobreexpresión conjunta de Pck1 y p300 no produjo el mismo efecto ($1.2 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n = 3$, $p = 0.1275$). Este resultado mostró que la capacidad gluconeogénica de Pck1 se ve afectada por la presencia de p300. Tanto la sobreexpresión conjunta de Pck1 con SIRT1 ($1.8 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n = 3$, $p = 0.0055$) como la de Pck1 con SIRT1 y p300 ($2.3 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n = 3$, $p = 0.0056$) produjo una cantidad semejante de glucosa comparada con la de las células que sólo expresaron Pck1 (Figura 3.25).

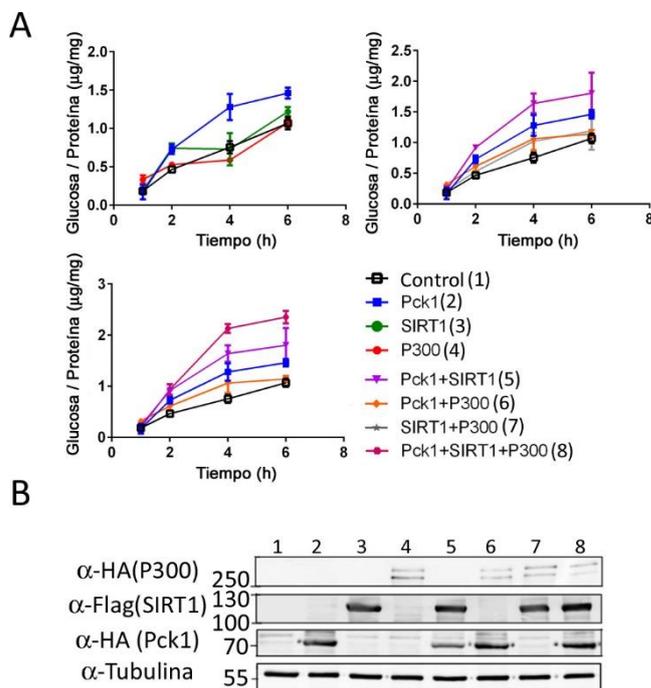


Figura 3.25. Efectos de la presencia de SIRT1 y/o p300 en la capacidad gluconeogénica de Pck1. (A) Las células HEK293T coexpresaron distintas combinaciones de SIRT1 y/o p300. El medio se eliminó y se reemplazó por medio de producción de glucosa. Los gráficos representan la producción de glucosa (media y desviación estándar, $n=3$) en cada condición a lo largo de 6 horas. La leyenda indica cada condición testada. Para facilitar la comprensión, el gráfico aparece dividido en tres. (B) western blot representativo de las condiciones usadas en (A). Los números (1-8) hacen referencia a los números expresados en paréntesis en (A). Los números a la izquierda representan el peso molecular (kDa).

Los resultados mostrados indican que la concentración de glucosa es un factor clave a la hora de determinar la actividad de Pck1, sugiriendo un posible papel de la acetilación mediada por p300 en dicho fenómeno.

3.3.3. Propiedades cinéticas y dinámicas de la Pck1 acetilada

Teniendo en cuenta que p300 es una acetil-transferasa y que ésta modificó la actividad de la Pck1 sobreexpresada en células HEK293T, se decidió determinar los niveles de

acetilación de Pck1 purificada a partir de dichas células expuestas a diferentes concentraciones de glucosa. Por medio de western blot, se observó que la señal de Pck1 acetilada es mayor cuando proviene de células sometidas a altas concentraciones de glucosa (Figura 3.26).

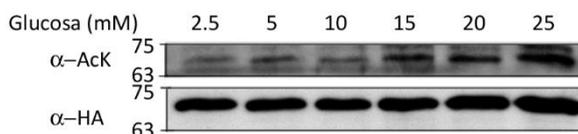


Figura 3.26. Efecto de la concentración de glucosa sobre el nivel de acetilación de Pck1. HA-Pck1-6xHis fue purificada utilizando resina de níquel a partir de células HEK293T y el nivel de acetilación analizado por western blot. AcK = Acetil-lisina.

Con el fin de conocer qué sitios estaban acetilados, se analizaron las muestras obtenidas a distintas concentraciones de glucosa por medio de espectrometría de masas (MS), utilizando un método cuantitativo, previamente descrito (Baeza et al., 2014, 2015). Este método utiliza un isótopo (D6-anhídrido acético) durante la preparación de las muestras que acetila todas las lisinas no acetiladas en la célula. Este marcaje genera dos poblaciones “ligera” y “pesada”, claramente diferenciables por MS. La relación entre las señales ligera y pesada permite conocer el porcentaje de acetilación. Antes de la preparación de las muestras, la Pck1, obtenida a partir de células HEK293T expuestas a distintas concentraciones de glucosa, se trató con SIRT1 o SIRT2 recombinantes y se comparó con la proteína no tratada. El objetivo fue determinar qué sitios eran dianas de estas dos deacetilasas. En la Tabla 3.8 se puede observar que el único residuo acetilado que se detectó fue la lisina 91 (Lys91ac), entre un 6 y un 19%, en función de la concentración de glucosa. Además, el tratamiento con SIRT1, pero no con SIRT2, redujo los niveles de acetilación hasta entre el 0 y el 6%, dependiendo de la muestra.

Tabla 3.8. Determinación del porcentaje de acetilación en los residuos de Pck1. Lys91ac = Lisina 91 acetilada. SIRT1/2 = Muestras tratadas con SIRT1 o SIRT2 previamente.

Lys91ac (%)	Concentración de glucosa (mM)		
	10	15	20
Control	6.21	19.12	14.76
SIRT1	0.00	0.00	6.38
SIRT2	10.02	26.68	23.96

Este mismo experimento se repitió con las muestras de Pck1 provenientes de células que también sobreexpresaron la acetil-transferasa p300 (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Determinación del porcentaje de acetilación en los residuos de Pck1 a partir de muestras provenientes de células que sobreexpresaron también la acetil-transferasa p300. Ctrl = Pck1 no tratada, SIRT1/2 = Pck1 previamente tratada con SIRT1 o SIRT2.

Posición del residuo	Concentración de glucosa (mM)											
	5			10			15			20		
	Ctrl	SIRT1	SIRT2	Ctrl	SIRT1	SIRT2	Ctrl	SIRT1	SIRT2	Ctrl	SIRT1	SIRT2
29	1.12	0.02	0.06	0.94	0.15	0.21	0.35	0.00	0.10	0.49	0.00	0.19
91	3.39	2.67	4.34	10.77	4.14	13.15	4.86	2.36	2.42	3.18	4.33	3.55
191	3.13	1.01	1.15	18.58	4.51	5.77	6.62	1.60	3.08	4.06	1.16	0.69
204	1.89	5.95	4.10	7.06	5.73	4.01	1.33	2.21	1.20	26.53	2.59	1.36
276	1.25	0.23	1.63	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.25	0.26	0.00
304	0.00	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.00	0.37	0.00	0.00	0.61
582	0.11	0.06	0.07	0.10	0.10	0.18	0.05	0.03	0.02	0.03	0.05	0.03
616	2.84	0.04	1.74	1.38	0.00	1.11	0.21	0.00	0.02	0.38	0.00	0.34
276,277,278	2.05	0.00	0.48	2.93	0.59	1.06	0.56	0.00	0.00	0.30	0.00	0.61
68, 70,71	1.01	0.63	0.61	1.67	0.65	1.22	0.70	0.56	2.00	7.59	2.23	0.40

En la Tabla 3.9 se puede observar que la presencia de p300 incrementa considerablemente el número de residuos acetilados, especialmente los residuos 91, 191 y 204 en los que el porcentaje de acetilación oscila entre un 13 y un 26% dependiendo de la concentración de glucosa. En general, el tratamiento con ambas

sirtuinas redujo los niveles de acetilación de Pck1. En la condición de 10 mM glucosa, se observa que SIRT1 fue capaz de deacetilar el residuo 91, al contrario que SIRT2, que no modificó los niveles de acetilación del mismo. Este patrón no se observó en otras muestras, como sí puede observarse en la Tabla 3.8. Estos resultados indican que una gran parte de las lisinas expuestas son susceptibles de ser acetiladas por p300 y confirman que este proceso es dependiente de glucosa.

A la vista de los resultados anteriores y con el fin de comprender las consecuencias de la acetilación sobre la actividad de Pck1, se analizaron algunas de las propiedades cinéticas de la Pck1 purificada a partir de células. En concreto se utilizaron las muestras de Pck1 provenientes de células HEK293T expuestas a 10 mM (Pck1-10mM) y 15 mM (Pck1-15mM) glucosa ya que fueron las que mostraron una diferencia de actividad considerable (Figura 3.22 y Figura 3.24) además de un nivel de acetilación distinto (Figura 3.26 y Tabla 3.8). En la Tabla 3.10 aparecen recogidos los resultados de los diferentes ensayos.

Tabla 3.10. Caracterización cinética de la Pck1 purificada a partir de células HEK293T expuestas a diferentes concentraciones de glucosa (10 y 15 mM).						
Muestra*	A) OAA+GTP → PEP+GDP+CO₂					
	OAA			GTP		
	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)
10 mM	35±5	33±1.3	9.4×10 ⁵	170±21	40±1.7	2.4×10 ⁵
15 mM	46±10	21±1.4	4.5×10 ⁵	151±32	22±1.6	1.5×10 ⁵
	B) PEP+GDP+CO₂ → OAA + GTP					
	PEP			GDP		
	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)
10 mM	208±33	17±0.8	8.3×10 ⁴	63±11.3	16±0.8	2.5×10 ⁵
15 mM	87±13	11±0.4	1.3×10 ⁵	29±4	11±0.3	3.8×10 ⁵
15mM	C) PEP+GDP+CO₂ → OAA + GTP (después del tratamiento con SIRT1 o SIRT2)					
	PEP			GDP		
	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)	<i>K_m</i> (μM)	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹ s⁻¹)
SIRT1	526±99	27±2.6	5.1×10 ⁴	113±15	26±1	2.3×10 ⁵
SIRT2	78±17	8.7±0.4	1.2×10 ⁵	25±3.2	9.2±0.2	3.7×10 ⁵

* Muestra = Pck1 purificada a partir de células HEK293T expuestas a la concentración de glucosa señalada (10 ó 15 mM).

En la Tabla 3.10 se puede observar que hay un descenso de entre un 30 a un 40% en el valor de k_{cat} en el sentido de reacción gluconeogénico (de OAA a PEP, reacción A). En el sentido glicolítico (reacción B), en la muestra Pck1-15mM los valores de K_m para los sustratos PEP y GDP disminuyeron alrededor de 2 veces respecto a Pck1-10mM. Aunque la velocidad de reacción (k_{cat}) fue un poco inferior para ambos sustratos, la eficiencia catalítica de la reacción (k_{cat}/K_m) fue dos veces superior en ambos casos en comparación con las eficiencias catalíticas para esos sustratos de Pck1-10mM. Con estos resultados, las muestras Pck1-15 mM se trataron con SIRT1 o SIRT2 para determinar si las propiedades cinéticas eran modificadas como consecuencia de la deacetilación, al igual que sucedió con la V_{max} al tratar con SIRT1 (Figura 3.24). De nuevo, se observó que el tratamiento con SIRT1, pero no con SIRT2, recuperó las propiedades cinéticas del enzima Pck1-15mM, siendo semejantes a las de la muestra Pck1-10mM (Tabla 3.10C).

Los resultados de MS indicaron que las lisinas 29, 68, 70, 71, 91, 191, 204, 276, 277, 278, 304, 582 y 616 eran susceptibles de ser acetiladas en células. La acetilación de PCK1 ha sido descrita en varios residuos en diferentes especies: humano (Zhao et al., 2010), ratón (Weinert et al., 2013) y rata (Lundby et al., 2012). Los residuos acetilados que se conocen son 70, 71, 124, 521, 524 y 594, cuyas posiciones coinciden entre las distintas especies mamíferas. Las muestras analizadas por MS revelaron nuevos sitios, pero el residuo 91 destacó sobre los demás ya que se detectó sin necesidad de sobreexpresar p300 (Tabla 3.8 y Tabla 3.9). Sin embargo, las muestras purificadas a partir de células HEK293T no eran homogéneas, es decir, un porcentaje máximo de un 20-25% de la muestra estaba acetilado en único sitio. Por ello se analizaron, en primer lugar, los efectos de la acetilación sobre las propiedades cinéticas utilizando una sustitución lisina a glutamina (K-Q) en los residuos mencionados (Véase Tabla 3.11). La glutamina imita el efecto de la acetilación, presentando una cadena lateral semejante a la de una acil-lisina. En general, los mutantes K-Q no dieron resultados muy diferentes a los obtenidos para la Pck1 salvaje, no mutada (Tabla 3.11). Cabe destacar que el mutante p.K91Q incrementó en tres veces el valor de K_m para el sustrato PEP dando lugar a un descenso de la eficiencia catalítica de 2.7 veces, y en el caso del mutante p.K521Q se vio un incremento

de 2.2 veces en el valor de K_m para GTP, disminuyendo la eficiencia catalítica en 2 veces. Estos resultados tan dispares a los obtenidos anteriormente (Tabla 3.10) indican que o bien la acetilación no tiene efecto en la actividad de PCK1, habiendo otros factores implicados, o bien que los mutantes K-Q no imitan, en este caso, el efecto de la acetilación.

Tabla 3.11. Caracterización cinética de Pck1 salvaje y de los mutantes K-Q en ambos sentidos de la reacción.									
Sustrato	Parámetro	Salvaje	K70Q	K71Q	K91Q	K124Q	K521Q	K524Q	K594Q
A) OAA+GTP-> PEP+GDP+CO₂									
OAA	K_m (μM)	39±2.9	31±3.9	34±7.3	36±5	31±2.6	36±6	47±9	42±8
	k_{cat} (s^{-1})	76±1.6	61±2	56±3.3	62±2.4	42±1	59±2.7	60±3.5	61±3.4
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1.9×10^6	1.9×10^6	1.6×10^6	1.7×10^6	1.4×10^6	1.6×10^6	1.3×10^6	1.5×10^6
GTP	K_m (μM)	161±42	224±36	246±24	211±22	222±36	362±22	209±26	261±17
	k_{cat} (s^{-1})	65±7	52±3.9	47±2.2	46±2.2	42±3	68±2.2	45±2.5	55±1.7
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4×10^5	2.3×10^5	1.9×10^5	2.2×10^5	1.9×10^5	1.9×10^5	2.2×10^5	2.1×10^5
B) PEP+GDP+CO₂ -> OAA + GTP									
PEP	K_m (μM)	301±48	366.9±52	324±42	956±136	353±52	399±53	379±47	305±38
	k_{cat} (s^{-1})	27.2±1.4	24±1.2	22.4±1	29.7±2	23.8±1.2	31.2±1.5	25±1	23±0.9
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	8.5×10^4	6.5×10^4	6.9×10^4	3.1×10^4	6.7×10^4	7.8×10^4	6.5×10^4	7.5×10^4
GDP	K_m (μM)	79±5	105±20	108±9	88±13	106±14	105±11	123±20	108±14
	k_{cat} (s^{-1})	25±0.5	24±1.4	23±0.6	21±0.9	23±0.9	27±0.9	29±1.5	25±1
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	3.2×10^5	2.3×10^5	2.1×10^5	2.4×10^5	2.2×10^5	2.6×10^5	2.4×10^5	2.3×10^5
KHCO ₃	K_m (mM)	6.3±1	10.2±1.7	9.4±1	9.5±2.2	8.1±2	13.3±2.9	7.9±2.8	8±1.1
	k_{cat} (s^{-1})	31±1.4	23±1.2	22±0.7	21±1.5	15±1.1	28±2	18.6±2	22.3±0.9
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4.9×10^3	2.3×10^3	2.3×10^3	2.2×10^3	1.9×10^3	2.1×10^3	2.4×10^3	2.8×10^3

Se decidió entonces incorporar acetyl-lisinas a la Pck1 recombinante de manera específica utilizando un plásmido que sobreexpresa la acetyl-lisina-tRNA sintetasa (AcK-RS). Esta proteína es capaz de incorporar acetyl-lisinas cuando en la secuencia de mRNA se encuentra el codón de finalización UAG, generando así variantes acetyladas (K-AcK). La cepa bacteriana que se utilizó para la expresión fue *E. coli* BL21 ΔCobB , deficiente en la deacetylasa CobB (Baeza et al., 2014). El trabajo se centró en aquellos residuos más próximos al sitio activo, tanto los descritos en la literatura (521 y 524) como el residuo

91, detectado durante los experimentos y que fue el acetilado en las propias células HEK293T (Tabla 3.8). La lisina 91 se encuentra en el loop-R de Pck1 mientras que los residuos 521 y 524 se encuentran en el sitio de unión de GTP/GDP. Además se decidió estudiar el residuo 473 que ha sido detectado recientemente (Shen et al., 2016), ya que se encuentra en el loop- Ω (Figura 3.27).

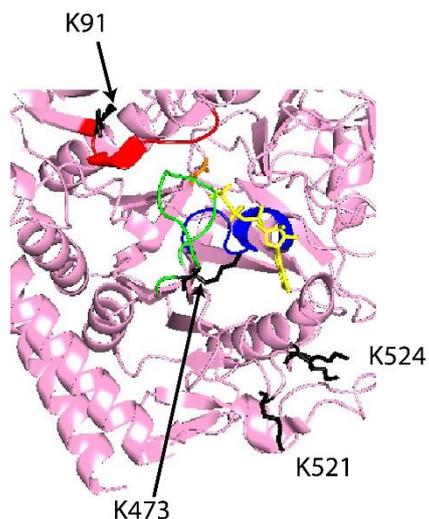


Figura 3.27. Detalle del sitio catalítico de PCK1. Representación de los “loops” R (rojo, residuos 85 a 92), P (azul, residuos 284 a 292) y Ω (verde, residuos 464 a 474). Se muestran además los ligandos oxalato (naranja) y GTP (amarillo). En negro aparecen las lisinas 91 (K91), 473 (K473), 521 (K521) y 524 (K524). Imágenes generadas a partir de la estructura de Pck1 de rata, PDB: 3DT2.

En la Tabla 3.12A se puede observar que, en todas las variantes, los parámetros cinéticos de la reacción en el sentido gluconeogénico apenas están modificados. Se observó un descenso de al menos un 30% en la velocidad de esta reacción salvo en el caso de la variante K524AcK. Sin embargo, en la reacción glicolítica se observaron diferencias en las variantes K91AcK, K473AcK y K521AcK con respecto a la enzima salvaje (Tabla 3.12B), mientras que la variante K524AcK se comportó igual que la Pck1 salvaje, no mutada. La variante K91AcK mostró un descenso de 4.2 veces en el valor de K_m para PEP y 5 veces en el caso de GDP. Esto dio lugar a una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) incrementada en 2.6 y 4.4 veces para PEP y GDP, respectivamente. La variante K473AcK disminuyó el valor de K_m para PEP en 3.8 veces, incrementándose la eficiencia catalítica en 2 veces. En el caso de la variante K521AcK, el valor de K_m para GDP descendió 4.4 veces, incrementándose la eficiencia catalítica 3 veces. En general, la acetilación favoreció la reacción glicolítica de PCK1, especialmente en el caso del residuo 91, donde los valores de k_{cat}/K_m estaban

aumentados y los de K_m disminuidos para los sustratos PEP y GDP en comparación con la enzima no modificada (Figura 3.28).

Tabla 3.12. Caracterización cinética de la Pck1 salvaje y las variantes acetiladas en ambos sentidos de la reacción.						
Sustrato	Parámetro	Salvaje	K91AcK	K473AcK	K521AcK	K524AcK
A) OAA+GTP-> PEP+GDP+CO₂						
OAA	K_m (μM)	77.3±10.6	54.6±11.1	84.9±17.9	50.3±11	62.4±14.5
	k_{cat} (s^{-1})	79±3.7	57.8±3.6	61.9±4.6	45.6±3	71.8±5.3
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1×10^6	1.1×10^6	7.3×10^5	9.2×10^5	1.2×10^6
GTP	K_m (μM)	172.1±31.6	126.6±24	143.5±33	141.5±25	160.7±27
	k_{cat} (s^{-1})	69.9±4.4	57±3.4	43.9±3.3	43±2.5	66.9±3.8
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4.1×10^5	4.5×10^5	3.1×10^5	3×10^5	4.2×10^5
B) PEP+GDP+CO₂ -> OAA + GTP						
PEP	K_m (μM)	320±59	75±16	84±22	276±57	250±46
	k_{cat} (s^{-1})	20.9±1.3	12.9±0.6	9.9±0.6	16.1±1	17.9±1
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	6.6×10^4	1.7×10^5	1.2×10^5	5.8×10^4	7.2×10^4
GDP	K_m (μM)	70.3±11.5	14.5±3.7	45.2±10.3	16.7±2.7	60.9±12.6
	k_{cat} (s^{-1})	14.9±0.8	13.3±0.7	12.9±0.9	10.7±0.4	19.2±1.3
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.1×10^5	9.2×10^5	2.9×10^5	6.5×10^5	3.1×10^5
KHCO ₃	K_m (mM)	13.1±3.2	11±1.5	5.6±1	10.6±2.2	12.3±1.5
	k_{cat} (s^{-1})	23.2±1.9	10.2±0.5	9.7±0.4	11.4±0.7	19.9±0.8
	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	1.8×10^3	9.1×10^2	1.7×10^3	1.1×10^3	1.6×10^3

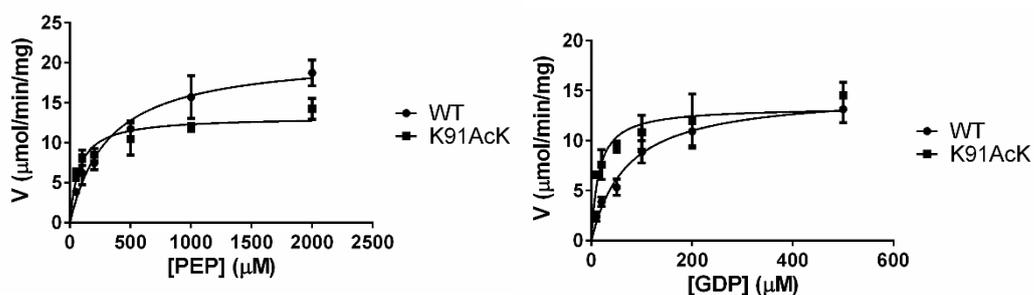


Figura 3.28. Representación de Michaelis-Menten de Pck1 salvaje y Pck1 p.K91AcK para los sustratos PEP y GDP. Representación gráfica de la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. Con fines comparativos, aparecen representados los valores para Pck1 salvaje (WT) y Pck1 p.K91AcK (K91AcK).

A la vista de los resultados mostrados, se decidió estudiar si el mecanismo de catálisis de Pck1 estaba afectado como consecuencia de la acetilación. Se ha descrito que PCK1 es capaz de llevar a cabo una actividad piruvato kinasa (PK). Esta actividad se ha visto aumentada en diversos mutantes localizados en el loop-R (Johnson et al., 2016) y es consecuencia de una alteración del mecanismo de catálisis para alcanzar el estado cerrado (Johnson and Holyoak, 2010, 2012; Johnson et al., 2016). Esta reacción se llevó a cabo igual que la que forma PEP a partir de OAA, pero excluyendo la enzima PK del ensayo acoplado. La variante Pck1 p.K524AcK se excluyó de este experimento ya que no mostró previamente diferencias en ningún parámetro cinético. Tal y como se puede apreciar en la Tabla 3.13, la actividad PK está aumentada en todas las variantes acetiladas estudiadas, siendo 6 veces mayor en el caso de la variante K91AcK (Figura 3.29).

Tabla 3.13. Determinación de la actividad PK para Pck1 salvaje y las distintas variantes K-AcK.			
Variante	OAA		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Salvaje	81.6±15	0.47±0.02	5.7×10^3
K91AcK	285±44	2.96±0.2	1×10^4
K473AcK	671±232	2.38±0.4	3.5×10^3
K521AcK	632±187	2.1±3	3.3×10^3

La determinación de la actividad PK sugirió que las variantes acetiladas de Pck1 tenían afectado el mecanismo de catálisis. Para conocer la magnitud de ese cambio se estudió una reacción de Pck1 que determina la capacidad de retención del intermediario enolato durante la reacción. Otros autores denominan “semireacción” a esta transformación (Johnson et al., 2016). La reacción se estudia con el mismo ensayo que el de la actividad PK, que descarboxila el OAA, pero el GTP es sustituido por GDP, de tal modo que el cierre del sitio activo de la Pck1 es posible, pero la reacción no puede producirse ya que se precisa GTP para llevarla a cabo. Al bloquear la reacción, el oxalacetato se transforma a enolato, que no progresa a PEP al no haber ningún donador de fosfato, pero se protona y forma piruvato directamente (Esquema 2.5, página 76). Esta reacción depende de la capacidad de la Pck1 de mantener el sitio activo cerrado durante la

catálisis el mayor tiempo posible protegiendo así al intermediario enolato. Así, en la Tabla 3.14, se puede apreciar que la reacción es mucho más eficaz en todas las variantes con respecto a la enzima no mutada (salvaje), pero en el caso de la variante K91AcK esta reacción es 9 veces más eficaz (Figura 3.29).

Tabla 3.14. Determinación de la capacidad de Pck1 salvaje y las variantes K-AcK para retener y proteger el intermediario enolato.			
Variante	OAA		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Salvaje	404 \pm 91	3.4 \pm 0.3	8.4 x 10 ³
K91AcK	49 \pm 8	3.6 \pm 0.1	7.3 x 10 ⁴
K473AcK	169 \pm 33	2.7 \pm 0.2	1.6 x 10 ⁴
K521AcK	139 \pm 38	2.4 \pm 0.2	1.7 x 10 ⁴

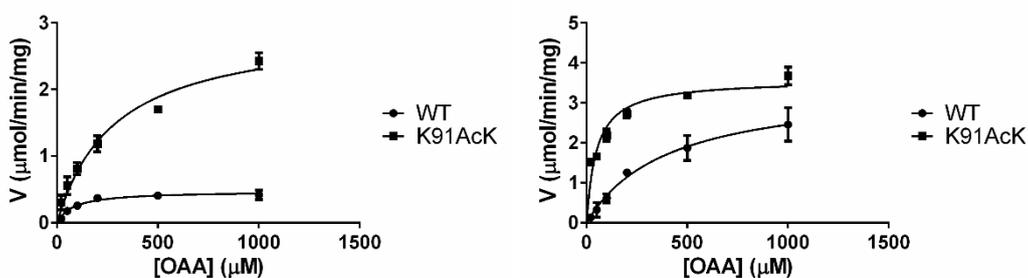


Figura 3.29. Representación de Michaelis-Menten de la reacción PK (izquierda) y la semi-reacción (derecha). La media y desviación estándar de tres experimentos independientes aparece representada. Con fines comparativos aparecen representados los valores de la Pck1 no mutada (WT) y la variante K91AcK (K91AcK).

En general, la capacidad cinética en el sentido gluconeogénico (OAA→PEP) se vio reducidas y la del sentido opuesto (PEP→OAA) incrementada. El hecho de que los cambios cinéticos asociados a la acetilación se observasen en residuos conservados (Lys91, Lys473 y Lys521) entre distintas especies mamíferas y no en otros (Lys524), sugiere un mecanismo de regulación de la actividad de Pck1 conservado (Figura 3.30).

Cerdo	EEEGVIKRLKKYDNCWLALTDPRDVARIESKTVIIITQEQRDAVPIPRSGLSQLGRWMSPE	120
Vaca	EEEGVIKRLKKYDNCWLALTDPRDVARIESKTVIIITREQRDTVPIPKNGLSQLGRWMSEE	120
Perro	EGQGMIKRLRKLNNCWALALTDPKDVARIESKTVIIITQEQRDTVPIPKTGLSQLGRWMSEE	120
Oso	EAEGMIKRLRKLNDNCWLALTDPGDVARIESKTVIIITQEQRDTVPIPKTGLSQLGRWMSEE	120
Humano	EEEGILRLRKKYDNCWLALTDPRDVARIESKTVIVITQEQRDTVPIPKTGLSQLGRWMSEE	120
Rata	QEEGVIRKLLKKYDNCWLALTDPRDVARIESKTVIIITQEQRDTVPIPKSGQSQLGRWMSEE	120
Ratón	QEEGVIRKLLKKYDNCWLALTDPRDVARIESKTVIIITQEQRDTVPIPKTGLSQLGRWMSEE	120
	* * * * *	
Cerdo	EAPEGVPIEGIIFGGRRPAGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGVIMHDPF	480
Vaca	ESPEGVPIEGIIFGGRRPVGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEYKGVIMHDPF	480
Perro	ESPEGVPIEGIIFGGRRPTGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGVIMHDPF	480
Oso	ESPEGVPIEGIIFGGRRPTGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHRGVIMHDPF	480
Humano	ESPEGVPIEGIIFGGRRPAGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGLIMHDPF	480
Rata	ESPEGVPIEGIIFGGRRPAGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGVIMHDPF	480
Ratón	ESPEGVPIEGIIFGGRRPEGVPLVYEALSWQHGVFVGAAMRSEATAAAEHKGLIMHDPF	480
	* * * * *	
Cerdo	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAQHPAAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENCRVLAWM	540
Vaca	AMGPFPGYNTGQYLAWHLSMAQRPAKLPKIFHVNWFRKDKAGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
Perro	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAQRPAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
Oso	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAQRPAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
Humano	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAQHPAAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
Rata	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAHRPAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
Ratón	AMRPFPGYNTGKYLAWHLSMAHRPAKLPKIFHVNWFRKDKDGRFLWPFGGENSRVLEWM	540
	* * * * *	

Figura 3.30. Alineamiento del mismo fragmento de PCK1 en diferentes especies indicando lisinas conservadas. Lys91, 473 y 521 (rojo) están conservadas, mientras que Lys524 (resaltada en amarillo) no. La acetilación de la Lys524 no modificó las propiedades cinéticas de Pck1. Las secuencias de referencia del NCBI son: Humano (NP_002582.3), rata (NP_942075.1), ratón (NP_035174.1), cerdo (NP_001116630.1), vaca (NP_777162.1), perro (NP_001184072.1) y oso (XP_008697693.1). Los números a la derecha indican la posición del último residuo de cada línea. Los asteriscos (*) indican residuos conservados en todas las especies.

Finalmente, se hicieron estudios estructurales para determinar diferencias entre la Pck1 y Pck1 p.K91AcK. Se ha descrito que en el parásito *Trypanosoma cruzi* la Pck1 es un dímero (Trapani et al., 2001) y se consideró la posibilidad de que la Pck1 de especies mamíferas sufriera un cambio semejante como consecuencia de la acetilación. El análisis por medio de cromatografía de filtración en gel mostró que ambas proteínas presentaban el mismo volumen de elución (Figura 3.31).

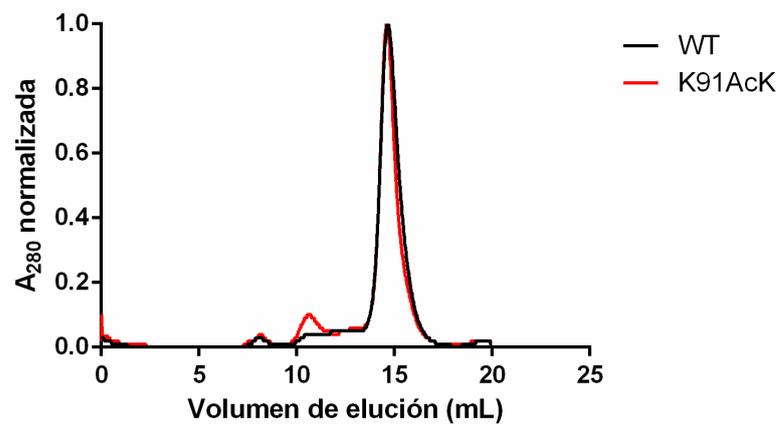


Figura 3.31. Superposición de la cromatografía de filtración en gel de Pck1 (WT) y la de Pck1 p.K91AcK (K91AcK). Ambas curvas se superponen. El pico detectado después de 10 mL corresponde con pesos superiores a 600 kDa.

Aunque se consiguió cristalizar ambas proteínas en presencia de GTP o GDP, no se apreciaron diferencias estructurales. Es más, la baja densidad electrónica de la región del loop-R indicó que era una región muy flexible. Por ello, se decidió comparar el comportamiento de ambas proteínas por medio de técnicas de dinámica molecular. Estas técnicas permiten simular el comportamiento de una proteína en una solución acuosa en un campo de fuerza en unas condiciones de presión y temperatura y han demostrado ser bastante precisas en cuanto a la predicción del comportamiento de las moléculas (Childers and Daggett, 2017). La información que proporcionan puede apoyar los resultados experimentales obtenidos.

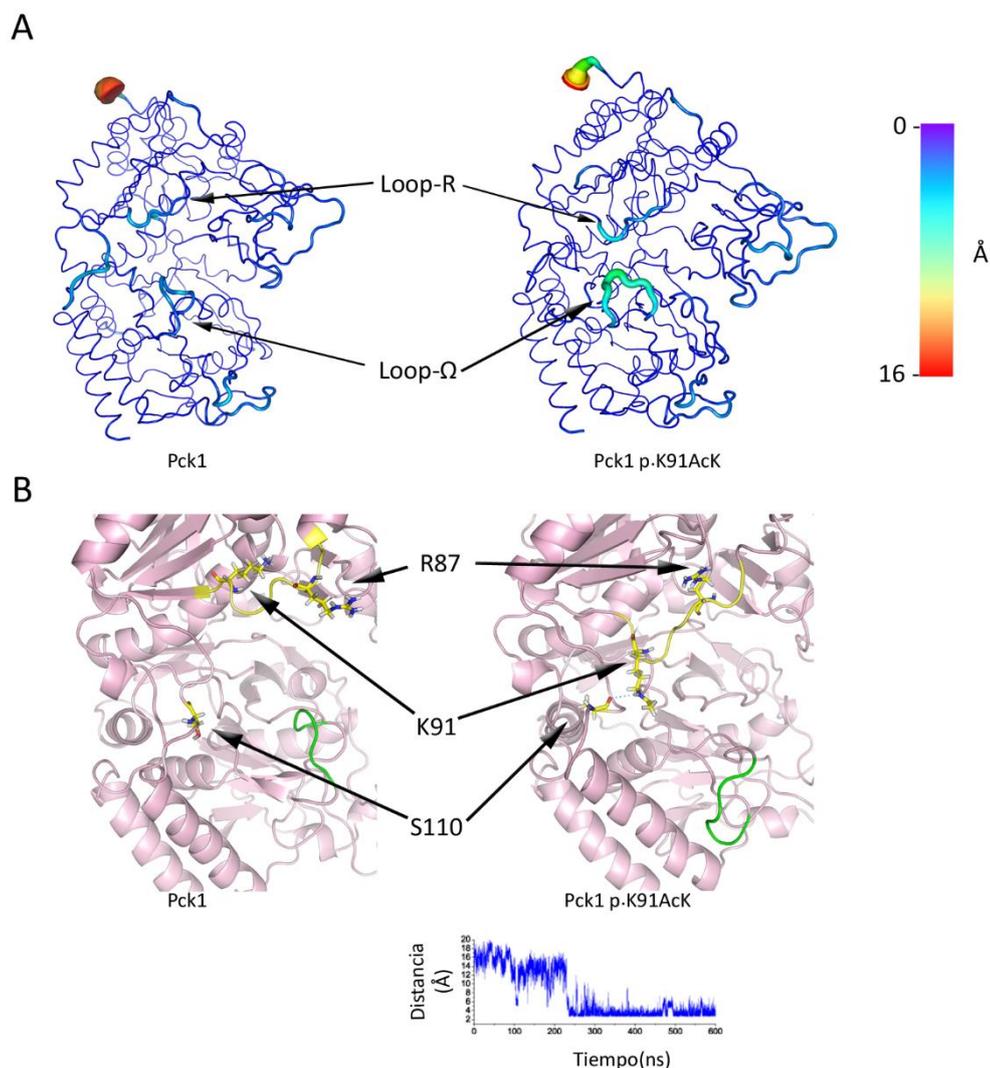


Figura 3.32. Simulaciones de dinámica molecular realizadas sobre Pck1 y sobre la variante p.K91AcK. (A) Representación de las fluctuaciones atómicas de Pck1 y Pck1 p.K91AcK. Los “loop” R y Ω aparecen señalados con fines comparativos. A la derecha se muestra la leyenda de la barra de color indicando el desplazamiento del residuo (Å). **(B)** Desplazamiento del aminoácido 91 (K91) durante las simulaciones y su posible interacción con la serina 110 (S110). La arginina 87 (R87) es esencial durante la catálisis y aparece señalada para resaltar el desplazamiento del loop-R (amarillo, residuos 85-92). En verde aparece representado el loop-Ω (residuos 464-474). Ambas regiones mostraron amplio desplazamiento durante las simulaciones. Abajo aparece representado el gráfico de distancia entre el grupo N-ε de Lys91ac y el grupo CO de Ser110. Se utilizó la estructura PDB 3DT2.

Se utilizó como modelo una estructura ya publicada de Pck1 de rata (PDB 3DT2). Se realizaron simulaciones tanto en presencia de los ligandos presentes en la estructura (Oxalato y GTP) como en su ausencia. En cristalografía, el oxalato se ha utilizado como análogo estable sustituyendo al oxalacetato (Johnson and Holyoak, 2012; Johnson et al., 2016). En ausencia de sustratos, se observó por un lado que la acetilación de la lisina 91

incrementó la movilidad del loop-R junto con la del loop- Ω . Por otro lado, se observó un posible puente de hidrógeno entre la lisina 91 y la serina 110 (Figura 3.32). El análisis de los datos de las distintas simulaciones mostró que, en presencia de sustratos, el loop- Ω fue mucho más flexible en la variante K91AcK (Figura 3.33). En conjunto, los resultados cinéticos y los datos de las simulaciones de dinámica molecular indicaron que la acetilación de la lisina 91 afectaría claramente al sitio activo como consecuencia de un cambio de flexibilidad de dos “loops” esenciales para la catálisis (Carlson and Holyoak, 2009; Johnson and Holyoak, 2010; Johnson et al., 2016).

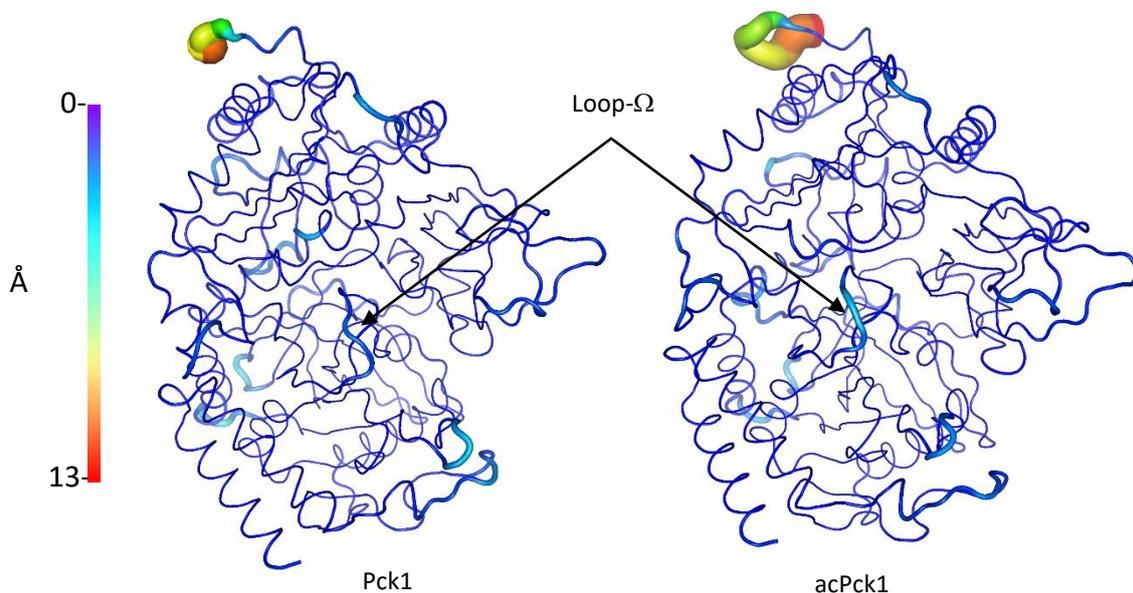


Figura 3.33. Representación de las fluctuaciones atómicas de Pck1 y Pck1 p.K91AcK en presencia de sustratos. Como se puede observar, hay un incremento de la flexibilidad en el Loop- Ω en el caso de la variante acetilada p.K91AcK (acPck1) con respecto a la enzima salvaje (Pck1). La escala de color a la izquierda representa la distancia de la fluctuación de los residuos (Å). La estructura utilizada para las simulaciones es la misma que en la Figura 3.32.

3.3.4. Deacetilación de Pck1 dependiente de SIRT1 *in vivo* e *in vitro*

Tanto SIRT1 (Dominy et al., 2012; Rodgers and Puigserver, 2007; Rodgers et al., 2005) como PCK1 (Yang et al., 2009a) están involucradas en la gluconeogénesis. Los resultados de MS (Tabla 3.8 y Tabla 3.9), los experimentos de cinética (Tabla 3.12 y Figura 3.24) y los ensayos de producción de glucosa (Figura 3.25) indican un posible papel de SIRT1 en la regulación de la actividad de PCK1. Para determinar la capacidad de SIRT1 de deacetilar Pck1 se utilizaron distintas aproximaciones. En primer lugar, se incubaron las muestras de proteína (Pck1-10mM y Pck1-15mM) con SIRT1 o SIRT2 independientemente, en un ensayo *in vitro*, igual al que se realizó para el análisis por MS y se detectó el nivel de acetilación por western blot. En la Figura 3.34 se observa que la incubación con SIRT1 disminuye los niveles de acetilación de Pck1.

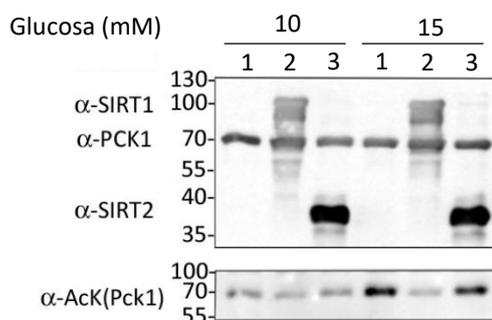


Figura 3.34. Deacetilación de Pck1 purificada a partir de células HEK293T. Las muestras de Pck1 (α -PCK1) que se obtuvieron para los ensayos de MS (Pck1-10mM y Pck1-15mM) se incubaron con una de las dos sirtuinas recombinantes humanas, SIRT1 (α -SIRT1) o SIRT2 (α -SIRT2) a 30°C durante 1 hora en presencia de NAD⁺. Las muestras se analizaron por western blot determinando el nivel de acetil-lisina (α -AcK). Los números a la izquierda indican el peso molecular. 1.- Pck1 en presencia de 0.5 mM NAD⁺. 2.- Pck1 en presencia de 0.5 mM NAD⁺ y SIRT1. 3.- Pck1 en presencia de 0.5 mM NAD⁺ y SIRT2.

Con el fin de confirmar esta interacción en células, Pck1 se sobreexpresó en células HEK293T en ausencia o en presencia de SIRT1 humana marcada con el epítipo Flag (Flag-SIRT1), también sobreexpresada. Como control se utilizó el mutante inactivo de SIRT1 p.H363Y. Pck1 fue inmunoprecipitada utilizando el epítipo HA y el nivel de acetilación se determinó por western blot. La presencia de SIRT1 disminuyó los niveles de acetilación de Pck1 (Figura 3.35).

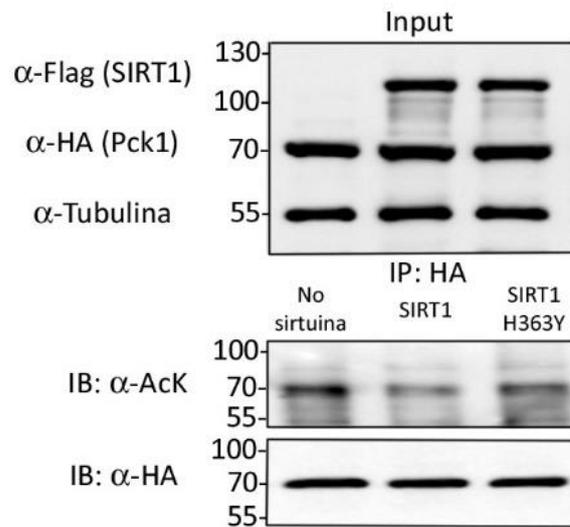


Figura 3.35. Deacetilación de Pck1 en células HEK293T en presencia de SIRT1. Se sobreexpresaron tanto Pck1 (α -HA) como SIRT1 o el mutante inactivo SIRT1 p.H363Y (α -Flag). Pck1 fue inmunoprecipitada y el nivel de acetilación (α -AcK) determinado por western blot. Los números a la izquierda indican el peso molecular. El western blot mostrado es representativo de tres experimentos independientes.

En contraposición al experimento anterior, se diseñaron sondas de RNA de interferencia dirigidas específicamente contra SIRT1 o bien SIRT2 con el objetivo de silenciar la expresión de estas proteínas y comprobar si, en este caso, los niveles de acetilación de PCK1 se modificaban. Se incluyó el silenciamiento de SIRT2 en este experimento con fines comparativos. Para aumentar la potencia del experimento, se trabajó con células HEK293T y HepG2. Inicialmente el experimento se planteó trabajando con la PCK1 endógena, pero fue imposible ya que en ningún caso se consiguió la inmunoprecipitación de la misma utilizando dos anticuerpos distintos. Lo único que se pudo comprobar es que, a diferencia de lo que sucedió en las células HEK293T, el nivel de PCK1 en células HepG2 disminuyó al silenciar la expresión de SIRT1 (Figura 3.36), como ya han descrito otros autores (Lin et al., 2009).

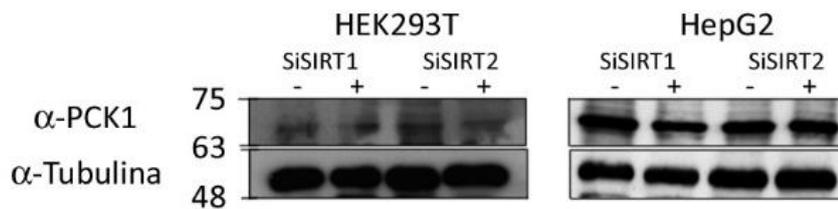


Figura 3.36. Efecto del silenciamiento de SIRT1 o SIRT2 sobre los niveles de PCK1 endógena en células HEK293T y HepG2. Se determinaron los niveles endógenos de PCK1 (α -PCK1) al silenciar SIRT1 (SiSIRT1) o SIRT2 (SiSIRT2) y se comparó con los RNA control (-). Como control de carga se usó tubulina. Los números a la izquierda indican el peso molecular. El western blot mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

La imposibilidad de inmunoprecipitar la PCK1 endógena llevó a sobreexpresar la construcción HA-Pck1-6xHis de nuevo al mismo tiempo que se silenciaban SIRT1 o SIRT2. En la Figura 3.37 se observa que, en células HEK293T, los niveles de acetilación de Pck1 aumentan al silenciar tanto SIRT1 como SIRT2, pero en el caso de las células HepG2 estos niveles sólo aumentan al silenciar SIRT1.

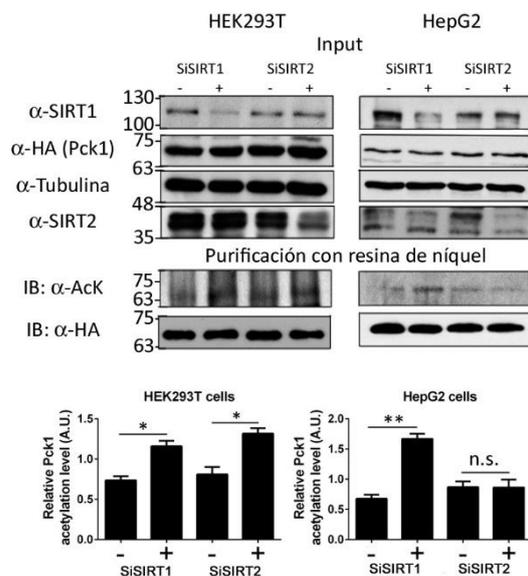


Figura 3.37. Efecto del silenciamiento de SIRT1 o SIRT2 sobre los niveles de acetilación de Pck1 en células HEK293T y HepG2. Se determinaron los niveles de acetilación (α -AcK) de Pck1 sobreexpresada (α -HA) al silenciar SIRT1 (SiSIRT1) o SIRT2 (SiSIRT2) y se comparó con los RNA control. Los números a la izquierda indican el peso molecular. El western blot mostrado es representativo de dos experimentos independientes. SIRT2 endógena presenta dos bandas debido a la existencia de dos isoformas. IB = Inmunoblot. A la derecha aparece la cuantificación del nivel relativo de acetilación en ambas líneas celulares expresando la media y desviación estándar. Por medio de un test-t se compararon las medias (n=2) que en algunos casos fueron significativas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. = no significativo.

Además, se analizó la actividad en condiciones de V_{max} de esta Pck1 purificada. El silenciamiento de SIRT1 redujo la velocidad de la reacción gluconeogénica un 40% en

células HEK293T y un 70% en células HepG2 mientras que la velocidad en el sentido contrario permaneció prácticamente invariable (Figura 3.38).

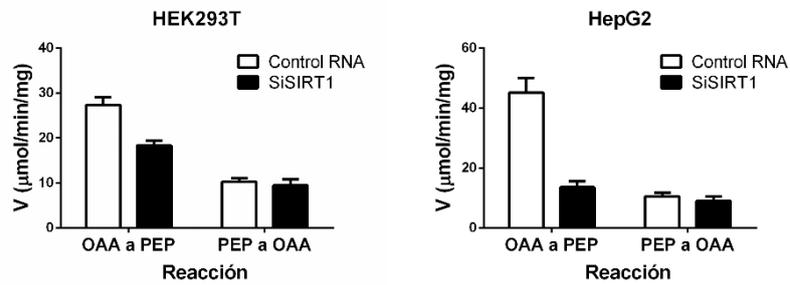


Figura 3.38. Efecto del silenciamiento de SIRT1 en células HEK293T y HepG2 sobre la actividad de Pck1. La Pck1 se sobreexpresó al mismo tiempo que se silenció SIRT1 en las dos líneas celulares gluconeogénicas. La velocidad se midió en condiciones de V_{max} en ambos sentidos de la reacción. En los gráficos se representa la media y desviación estándar de dos experimentos independientes. La velocidad de los dos sentidos de la reacción catalizada por la Pck1 proveniente de células con silenciamiento de SIRT1 (SiSIRT1) se comparó con la de las células control (Control RNA).

Finalmente, se analizaron los efectos de la acetilación de Pck1 *in vivo*. Inicialmente, la Pck1 se purificó parcialmente de tejidos gluconeogénicos de ratones salvajes Sirt1^{+/+} y ratones Sirt1^{-/-} (Figura 3.39) utilizando columnas de intercambio iónico. La purificación a partir de muestras de riñón rindió Pck1 con menos proteínas contaminantes.

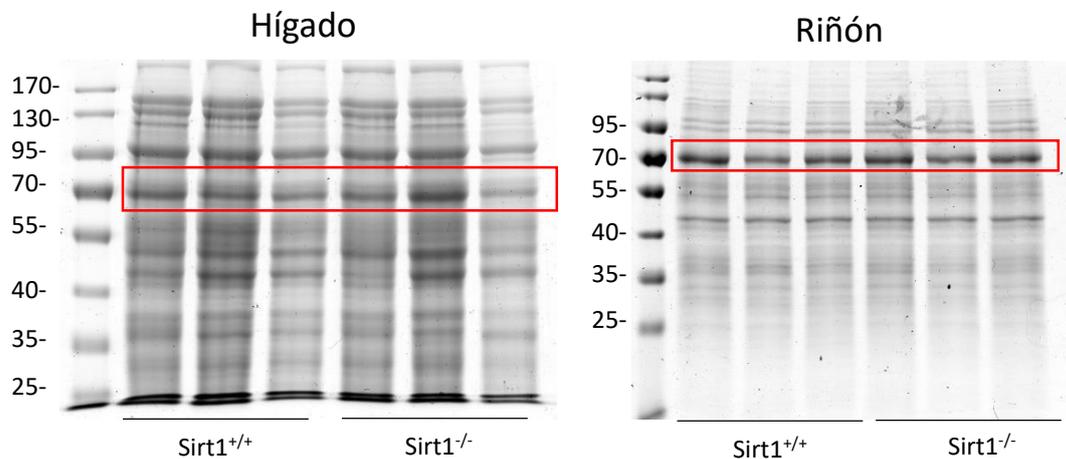


Figura 3.39. Purificación parcial de Pck1 a partir de tejidos de ratón. Geles del 10% poliacrilamida mostrando el resultado de la purificación en diversas muestras. En rojo aparece enmarcada la banda correspondiente a Pck1. Sirt1^{+/+} = Muestras provenientes de animales no modificados. Sirt1^{-/-} = Muestras provenientes de animales que no expresaron Sirt1. Cada carril representa una muestra proveniente de un animal.

Se midió la actividad en condiciones de V_{max} tanto de las muestras de Pck1 purificadas de animales no modificados como de aquellos que tenían la expresión de Sirt1 abolida y también se analizaron los parámetros cinéticos para los sustratos PEP y GDP (Figura 3.40).

Como se puede observar en la Figura 3.40A y en la Tabla 3.15, las muestras de proteína procedentes de animales deficientes en Sirt1 mostraron un descenso del 30-40% en la actividad en el sentido gluconeogénico (de OAA a PEP) de la reacción y un 30-35% superior en el glicolítico (de PEP a OAA) tanto en Pck1 purificada de hígado como de riñón.

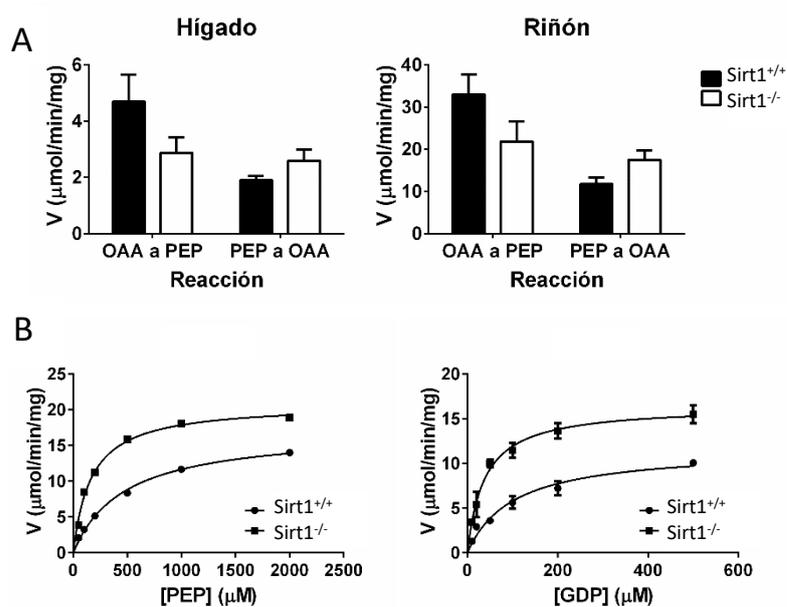


Figura 3.40. Efecto de la abolición de Sirt1 sobre la actividad Pck1 de ratón. (A) La actividad se midió en condiciones de V_{max} en ambos sentidos de la reacción en muestras de Pck1 purificadas a partir de hígado y de riñón. **(B)** Representación de Michaelis-Menten comparando las muestras de Pck1 de animales no modificados (Sirt1^{+/+}) y de aquellos deficientes en Sirt1 (Sirt1^{-/-}) para los sustratos PEP y GDP utilizando Pck1 purificada de riñón.

Tabla 3.15. Actividad de Pck1 purificada a partir de animales no modificados (*Sirt1*^{+/+}) y deficientes en *Sirt1* (*Sirt1*^{-/-}). La velocidad aparece representada en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Aparecen reflejadas la media y desviación estándar de las tres muestras analizadas por duplicado.

Reacción	Hígado		Riñón	
	<i>Sirt1</i> ^{+/+}	<i>Sirt1</i> ^{-/-}	<i>Sirt1</i> ^{+/+}	<i>Sirt1</i> ^{-/-}
OAA to PEP	4.7±1	2.9±0.6	33±4.7	22±4.8
PEP to OAA	1.9±0.1	2.6±0.4	12±1.6	18±2.3

También se determinaron los parámetros cinéticos para los sustratos PEP y GDP, sustratos para los que a lo largo de los experimentos se modificaron las propiedades cinéticas como consecuencia de la acetilación. En este caso sólo se utilizaron las muestras de Pck1 purificada a partir de riñón. En la Tabla 3.16 se puede observar que los valores de K_m tanto para PEP como GDP fueron 2.6 y 2.8 veces inferiores, respectivamente. Esto último sumado a un incremento de la velocidad (k_{cat}) de la reacción un 25% en el caso del PEP y un 20% en el caso del GDP dieron como resultado un incremento de 3.5 veces en la eficiencia catalítica.

Tabla 3.16. Constantes de Michaelis-Menten para los sustratos PEP y GDP a partir de las muestras de Pck1 purificadas a partir de riñón de animales no modificados (*Sirt1*^{+/+}) y deficientes en *Sirt1* (*Sirt1*^{-/-}).

Muestra	PEP			GDP		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
<i>Sirt1</i> ^{+/+}	471±33	17±0.4	3.6×10^4	101±16	12±0.7	1.2×10^5
<i>Sirt1</i> ^{-/-}	166±13	21±0.4	1.3×10^5	38±4	16±0.5	4.2×10^5

Para concluir, se analizaron los niveles de acetilación a partir de muestras de hígado y de riñón por medio de western blot. En primer lugar, se determinó la presencia de Pck1 en los extractos totales tras resuspender las muestras de tejido en el correspondiente tampón. En hígado, se observó que los animales deficientes en *Sirt1* tenían incrementados los niveles de Pck1 (Figura 3.41A).

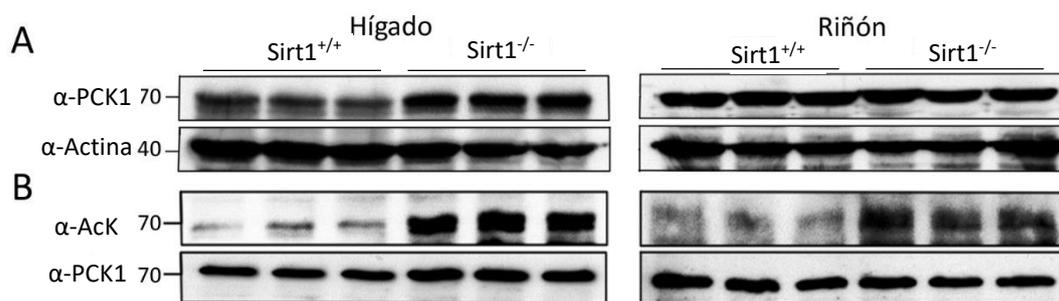


Figura 3.41. Detección del nivel de Pck1 y de Pck1 acetilada a partir de muestras de tejido de ratón. (A) Se determinaron los niveles de Pck1 (α -PCK1) a partir de las muestras de tejido de hígado y riñón. Se usó actina (α -Actina) como control de carga. **(B)** El nivel de acetilación (α -AcK) se detectó por western blot usando el antígeno Pck1 (α -PCK1) como control de carga. Cada carril representa una muestra animal distinta. Sirt1^{+/+} = Muestras de animales no modificados. Sirt1^{-/-} = Muestras de animales deficientes en Sirt1. Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa). Cada carril representa una muestra proveniente de un animal distinto.

Después se determinó el nivel de acetilación de la proteína ya purificada. En la Figura 3.41B se observa que las muestras de animales deficientes en Sirt1 presentan niveles más altos de Pck1 acetilada tanto en hígado como en riñón. En conjunto, los resultados muestran que SIRT1 es una deacetilasa de Pck1 capaz de regular su actividad gluconeogénica.

3.3.5. Efecto de la fosforilación sobre la estabilidad de Pck1 y su interacción con la acetilación

Aunque los resultados presentados mostraron que la SIRT1 era capaz de deacetilar la Pck1 purificada de células mamíferas, la deacetilación *in vitro* de Pck1 K91AcK no se pudo llevar a cabo en las mismas condiciones. SIRT1 fue capaz de deacetilar solamente un 50% de Pck1 K91AcK en presencia de 2 mM NAD⁺ (Figura 3.42).

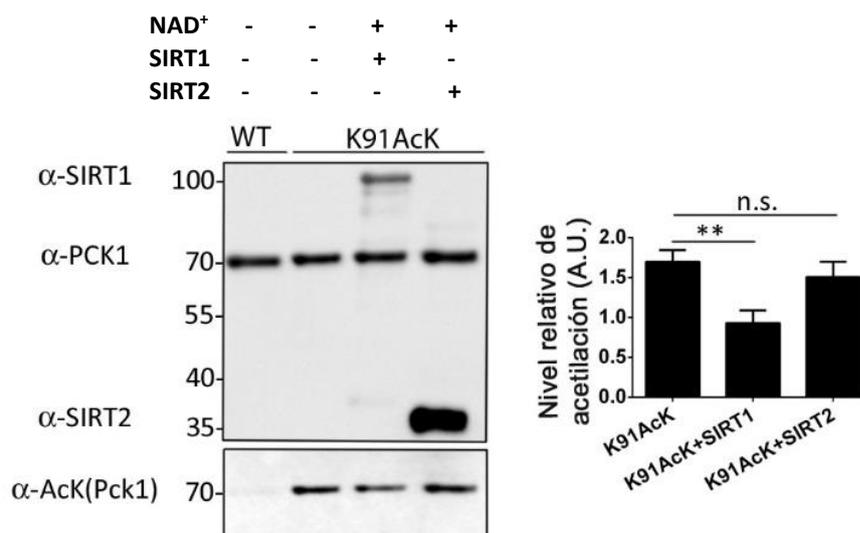


Figura 3.42. Deacetilación de Pck1 p.K91AcK recombinante in vitro. Pck1 (α -PCK1) se trató con SIRT1 (α -SIRT1) o SIRT2 (α -SIRT2) a 30°C y 2 mM NAD⁺. El nivel de acetilación (α -AcK) se determinó por WB, se normalizó al contenido en Pck1 y se comparó la proteína incubada con NAD⁺ no tratada (K91AcK) con la tratada con SIRT1 (K91AcK+SIRT1) o con la tratada con SIRT2 (K91AcK+SIRT2). A.U. = Unidades arbitrarias. ** $p < 0.01$, n.s. = no significativo. El gráfico representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa).

Este resultado planteó la posibilidad de que otras modificaciones post-traduccionales como la fosforilación contribuyesen a facilitar la deacetilación. Aunque no hay evidencias de un papel funcional de la fosforilación sobre PCK1, diferentes estudios de proteómica han detectado esta modificación en diferentes serinas y treoninas de PCK1 en tejidos de ratón (Grimsrud et al., 2012; Parker et al., 2015; Robles et al., 2017; Wilson-Grady et al., 2013), de rata (Demirkan et al., 2011; Lundby et al., 2012) y humano (Bian et al., 2014). Dada la dificultad de deacetilar la variante Pck1 K91AcK recombinante y el hecho de que la Lys91 está enmarcada entre una serina y una treonina conservadas entre las distintas especies (Figura 3.30), Ser90 y Thr92, se consideró que la fosforilación pudiera influir en la actividad de SIRT1 sobre Pck1.

Para continuar con esta hipótesis, se determinó si Pck1 estaba fosforilada. Se transfectaron células HEK293T, se lisaron, y la Pck1 se purificó utilizando resina de níquel. Las células se expusieron a distintas concentraciones de glucosa antes de la purificación. La fosforilación en serinas y treoninas se pudo determinar tanto en concentraciones de alta como de baja glucosa, pero fue significativamente mayor en condiciones de alta concentración de glucosa (1.6 veces, $n = 3$, $p = 0.0017$) (Figura 3.43). Estas mismas muestras se analizaron para determinar su nivel de acetilación. Igualmente, en condiciones de alta glucosa, el nivel de acetilación se incrementó en 3.4 veces ($n = 3$, $p = 0.0055$). Estos datos indicaron que las condiciones de alta concentración de glucosa indujeron un incremento en los niveles de acetilación y fosforilación.

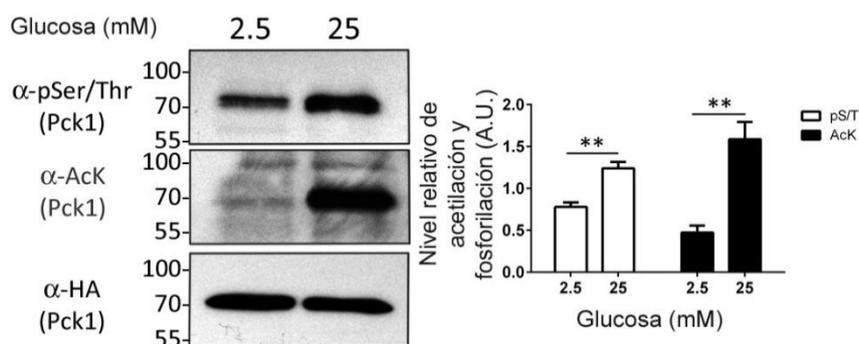
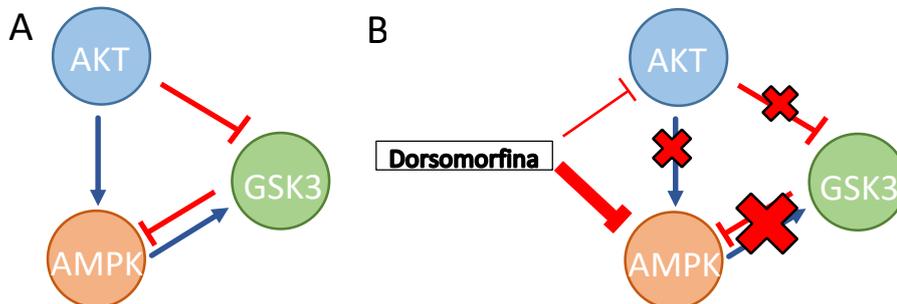


Figura 3.43. Nivel relativo de fosforilación y acetilación de Pck1 en células expuestas a baja y alta concentración de glucosa. La Pck1 fue purificada a partir de células HEK293T y su nivel de acetilación (α -AcK) y fosforilación en serinas y treoninas (α -pSer/Thr) fue determinado por densitometría y normalizado al contenido de Pck1 (α -HA). A la derecha se representan gráficamente la media y desviación estándar del resultado de tres experimentos independientes. ** $p < 0.01$. Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa).

Con el fin de identificar posibles kinasas responsables de la fosforilación de Pck1, se analizó el nivel de fosforilación y acetilación de Pck1 purificada a partir de células expuestas a diferentes inhibidores de kinasas. Debido al papel de AMPK (Horike et al., 2008), GSK3 (Lipina et al., 2005), MAPK (Xu et al., 2005) y mTOR (Montal et al., 2015) en la regulación de la expresión de PCK1 y/o la gluconeogénesis, éstas fueron las kinasas elegidas para inhibición química. La inhibición de la AMPK disminuyó los niveles de Pck1 sobreexpresada en un 40% ($n = 3$, $p = 0.0302$), incrementó el nivel de fosforilación de

Pck1 en 1.5 veces ($n = 4$, $p = 0.0131$) y disminuyó en 2 veces ($n = 4$, $p = 0.0045$) el nivel de acetilación de Pck1 con respecto al control (Figura 3.44A). Por otro lado, la inhibición de GSK3 disminuyó en 2.5 veces el nivel de fosforilación de Pck1 ($n = 4$, $p = 0.0011$). Además, la inhibición conjunta de AMPK y GSK3 no afectó a los niveles de Pck1 sobreexpresada, un efecto semejante al obtenido al tratar las células con el inhibidor de AMPK y el inhibidor del proteasoma MG132 (Figura 3.44B). La inhibición de mTOR y MAPK no modificó ni los niveles de proteína Pck1 ni su nivel de fosforilación.

La dorsomorfina, el inhibidor de AMPK, es además un inhibidor de AKT (Liu et al., 2014). A su vez, AKT fosforila e inhibe la actividad GSK3 (Beurel et al., 2015). De acuerdo con esta información, la inhibición de AMPK podría haber inhibido también AKT y dar como resultado GSK3 hiperactiva. Así, el incremento de fosforilación de Pck1 en presencia de dorsomorfina sería una consecuencia de una mayor actividad GSK3. Por el contrario, la inhibición de GSK3 explicaría la caída en los niveles de fosforilación (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Representación gráfica de la regulación de GSK3 a través de AKT y AMPK. (A) AKT es un activador de AMPK e inhibidor de GSK3. Sin embargo, AMPK es capaz de activar GSK3 y ésta a su vez inhibir AMPK. **(B)** La dorsomorfina, inhibidor de AMPK, es en ciertas dosis inhibidor de AKT. La inhibición de AKT podría conllevar la hiperactividad de GSK3 facilitando su activación a través de otras vías de señalización. En A y B Las flechas azules representan activación y las líneas rojas en forma de "T" inhibición. El grosor de la línea indica mayor inhibición.

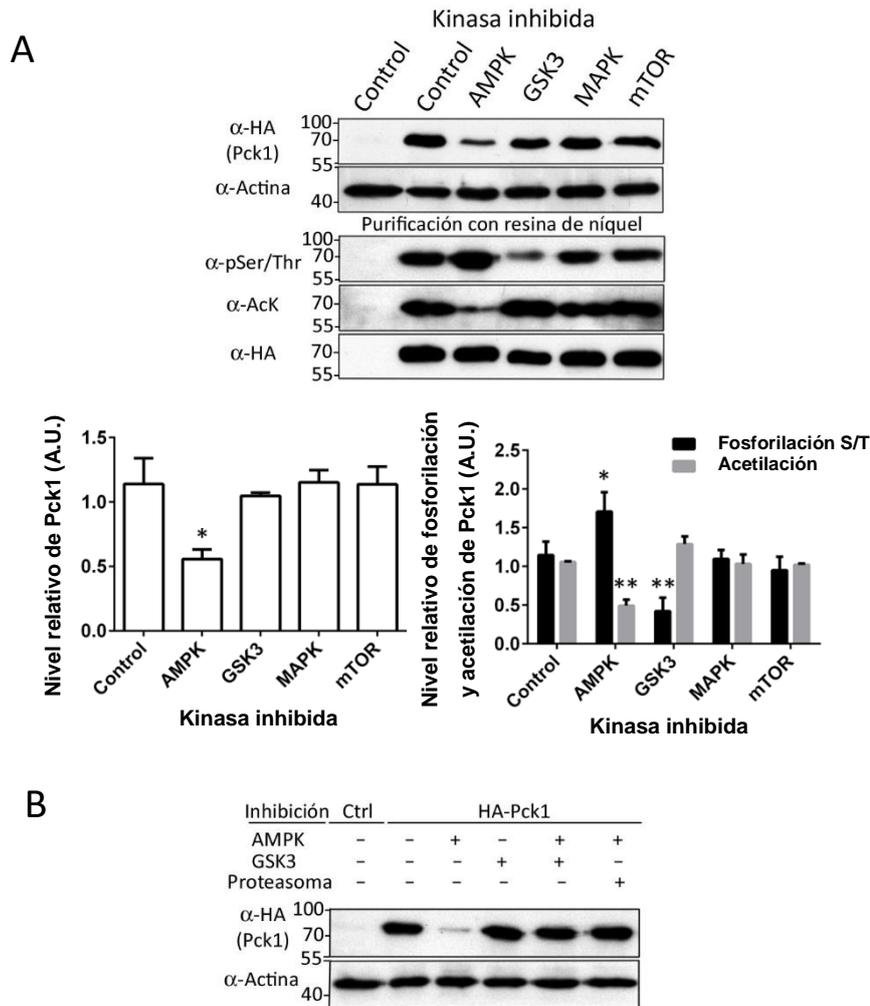


Figura 3.44. Determinación de los niveles de Pck1 sobreexpresada y de sus niveles de fosforilación y acetilación en células HEK293T tratadas con diferentes inhibidores de kinasas. (A) La Pck1 sobreexpresada (α -HA) fue purificada a partir de células HEK293T tratadas con diferentes inhibidores de kinasas y se determinó el nivel de fosforilación (α -pSer/Thr) y acetilación (α -AcK) por medio de western blot. El nivel de Pck1 de los extractos totales fue determinado por densitometría, normalizado al contenido de actina y representado gráficamente (panel inferior izquierdo, $n = 3$). Igualmente, el nivel relativo de fosforilación y acetilación determinado por densitometría fue calculado y representado (panel de abajo a la derecha, $n = 4$). Como control se usó DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **(B)** Determinación de los niveles de Pck1 sobreexpresada en células HEK293T tratadas con diferentes combinaciones del inhibidor de AMPK (dorsomorfin), del inhibidor de GSK3 (CHIR99021) y del inhibidor del proteasoma (MG132). El western blot mostrado es representativo de dos experimentos independientes. Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa).

Para comprobar esta hipótesis, se decidió trabajar con GSK3 β , que además es un represor de PCK1 a nivel transcripcional (Horike et al., 2008). El silenciamiento de GSK3 β produjo un descenso del nivel de fosforilación y ubiquitinación de Pck1 sobreexpresada

e incrementó su nivel de acetilación tanto en células HEK293T como en HepG2 (Figura 3.45A). La unión de cada ubiquitina a otras proteínas incrementa el peso molecular en 3 kDa. Esto explica el bandeo observado en los blots donde se detectó este antígeno, que indica la poliubiquitinación de Pck1. En el experimento complementario, la sobreexpresión de Pck1 y GSK3 β redujo los niveles de acetilación de la Pck1 sobreexpresada e incrementó el nivel de fosforilación y ubiquitinación (Figura 3.45B). Además, la sobreexpresión de GSK3 β redujo los niveles de Pck1 sobreexpresada a la mitad tanto en células HEK293T como en HepG2.

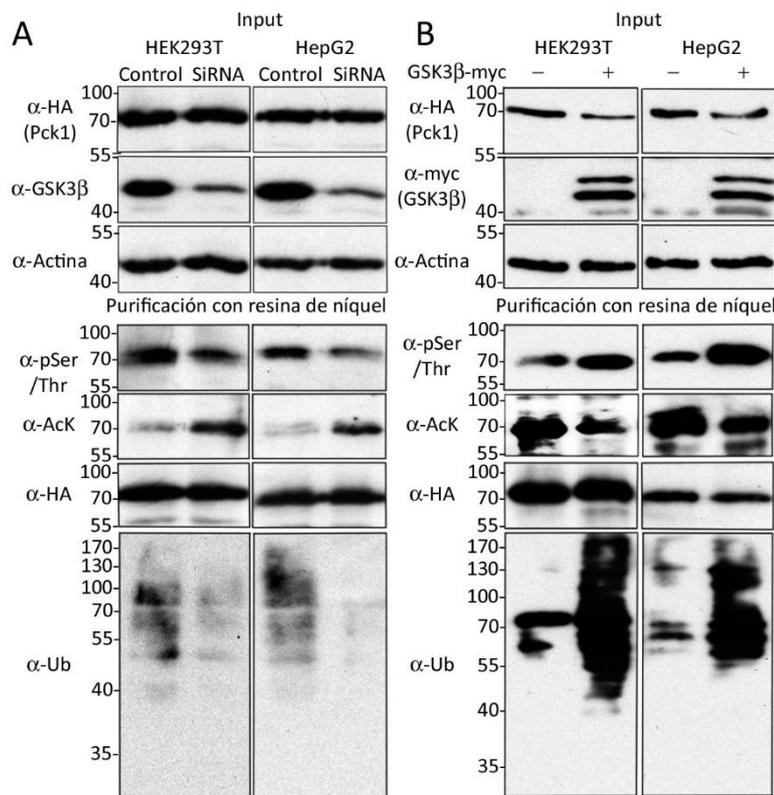


Figura 3.45. Efectos del silenciamiento y de la sobreexpresión de GSK3 β sobre los niveles de Pck1 sobreexpresada y su nivel de fosforilación y acetilación. (A) Pck1 fue sobreexpresada y purificada utilizando resina de níquel. Se determinaron los niveles de fosforilación (α -pSer/Thr), acetilación (α -AcK) y ubiquitinación (α -Ub) de Pck1 por medio de western blot cuando GSK3 β (α -GSK3 β) fue silenciada utilizando oligos de SiRNA específicos (SiRNA). **(B)** Del mismo modo que en (A) se determinaron los niveles de fosforilación, acetilación y ubiquitinación de Pck1 en ausencia (-) o en presencia (+) de GSK3 β (α -myc) sobreexpresada. En ambos casos, cada uno de los western blots mostrados son representativos de dos experimentos independientes. Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa).

A la vista de los resultados anteriores, se llevaron a cabo experimentos para determinar si GSK3 β fosforila directamente Pck1. Por un lado, se llevó a cabo un experimento de

fosforilación *in vitro* utilizando Pck1 y GSK3 β recombinantes. Por el otro, se sobreexpresaron Pck1 y GSK3 β en células HEK293T con el fin de copurificar ambas proteínas y determinar la posible interacción. Como puede observarse, GSK3 β no fosforiló Pck1 (Figura 3.46A) y tampoco fue co-purificada con Pck1 (Figura 3.46B), lo que indicó que o bien GSK3 β no fosforila directamente Pck1 o bien requiere de un primer sitio de fosforilación por parte de otra kinasa u otro tipo de interacción para actuar sobre el sustrato.

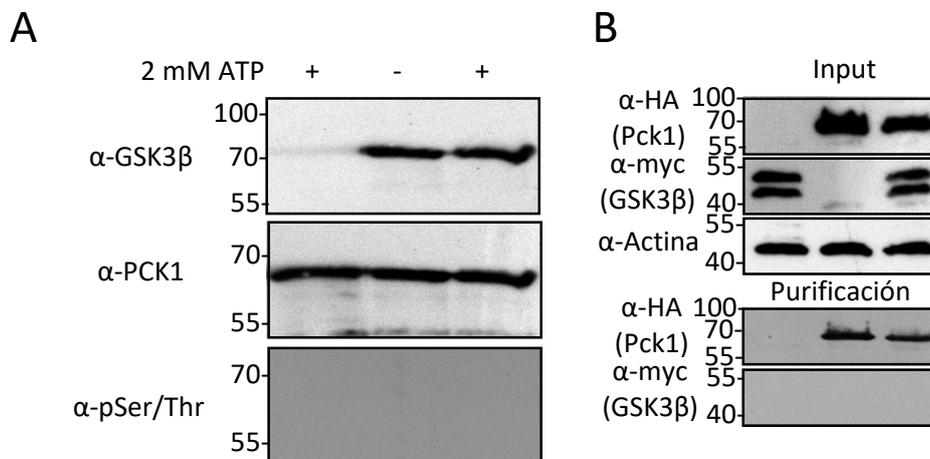


Figura 3.46. Estudio de la posible interacción entre GSK3 β y Pck1. (A) GST-GSK3 β recombinante (0.35 μ M; α -GSK3 β) fue incubada en presencia de Pck1 (1.4 μ M; α -PCK1) y 2 mM ATP durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C. El análisis por WB de la presencia de serinas y treoninas fosforiladas (α -pSer/Thr) no dio ninguna señal. En estas mismas condiciones, la Pck1 fue incubada toda una noche con el mismo resultado. El western blot muestra uno de estos experimentos. (B) Pck1 y GSK3 β fueron coexpresadas en células HEK293T. Pck1 (α -HA) se purificó utilizando resina de níquel y se detectó GSK3 β (α -myc) por WB. A pesar de utilizar diluciones de anticuerpo bajas, no se detectó GSK3 β . Los números a la izquierda de los blots indican el peso molecular (kDa). La presencia de dos bandas de GSK3 β indica que está fosforilada.

A la vista de los resultados mostrados, se decidió comprobar la hipótesis inicial, en la que se consideraba la posibilidad de que la fosforilación de residuos próximos a Lys91, Ser90 y Thr92, pudiera favorecer la deacetilación dependiente de SIRT1, estableciendo además una relación entre el nivel de acetilación, fosforilación y ubiquitinación de Pck1. En primer lugar, se determinó el nivel de fosforilación y acetilación de la Pck1 de rata y se comparó con los niveles de los mutantes p.S90A y p.T92A, diseñados para neutralizar cualquier fosforilación en esos residuos, que fueron sobreexpresados en células

HEK293T y purificados utilizando resina de níquel-agarosa. El mutante Pck1 p.S90A mostró niveles significativamente más bajos de fosforilación (55%, $n = 3$, $p = 0.017$) y ubiquitinación, y niveles más altos de acetilación (30%, $n = 3$, $p = 0.019$) (Figura 3.47). En el caso del mutante Pck1 p.T92A no se observaron diferencias con respecto a Pck1 salvaje. Además, el mutante Pck1 p.S90A mostró un tiempo de vida media mayor en comparación con la Pck1 salvaje (Figura 3.48) cuando las células fueron incubadas en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteína, y se mostró insensible a la presencia de GSK3 β sobreexpresada en células HEK293T (Figura 3.49).

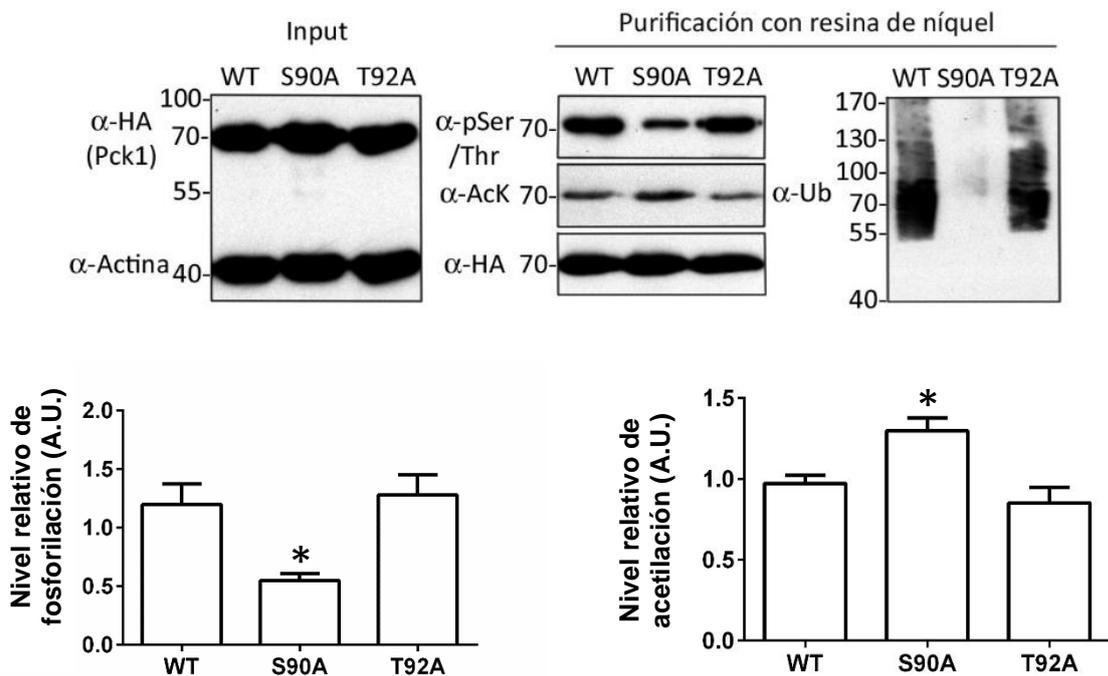


Figura 3.47. Efecto de las sustituciones S90A y T92A sobre el nivel de acetilación y fosforilación de Pck1. De manera independiente se sobreexpresaron en células HEK293T Pck1 salvaje (WT), el mutante Pck1 p.S90A (S90A) y Pck1 p.T92A (T92A) y se purificaron utilizando resina de níquel. Por medio de WB, se analizó el nivel de acetilación (α -AcK), fosforilación (α -pSer/Thr) y ubiquitinación (α -Ub). Se representaron gráficamente los niveles de acetilación y fosforilación normalizando al contenido en Pck1 (α -HA) (paneles inferiores). * $p < 0.05$, $n = 3$. A.U. = Unidades arbitrarias. Los números a la izquierda de los blots representan el peso molecular (kDa).

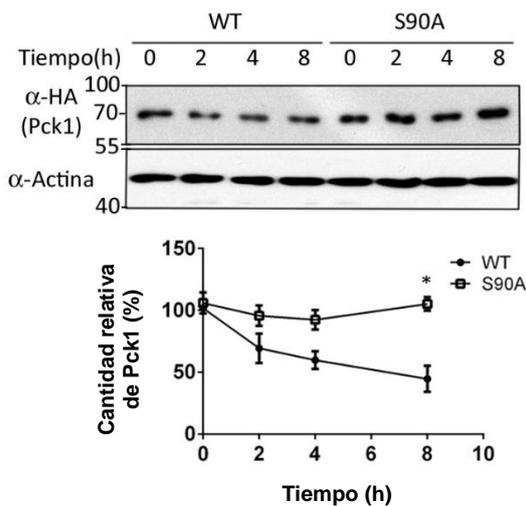


Figura 3.48. Determinación del tiempo de vida media de Pck1 y Pck1 p.S90A. Pck1 salvaje (WT) y Pck1 p. S90A (S90A) se expresaron independientemente en células HEK293T. Después de 24 horas, el medio se sustituyó por medio fresco suplementado con cicloheximida (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se tomaron muestras a distintos tiempos. La cuantificación se llevó a cabo analizando por densitometría los niveles de Pck1 ($\alpha\text{-HA}$) normalizados a la cantidad de actina ($\alpha\text{-Actina}$) expresados como porcentaje con respecto al tiempo inicial. El gráfico representa la media y desviación estándar de dos experimentos independientes. * $p < 0.05$.

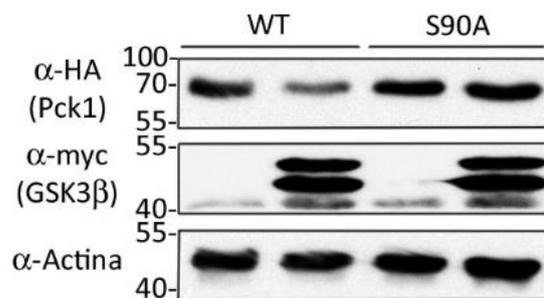


Figura 3.49. Efecto de la sobreexpresión de GSK3 β sobre los niveles de Pck1 salvaje (WT) y Pck1 p.S90A (S90A) en células HEK293T. De manera independiente, se sobreexpresaron ambas construcciones de Pck1 ($\alpha\text{-HA}$) en ausencia o presencia de GSK3 β ($\alpha\text{-myc}$) y se determinó el nivel de Pck1 por WB. El WB mostrado es representativo de dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos sobre el mutante S90A indicaron que éste era interesante para conocer el papel biológico de la acetilación y fosforilación de Pck1. Para ello se probó tanto la capacidad gluconeogénica como la de captación de glucosa, que es un indicador de la capacidad glicolítica, por parte de las células HEK293T sobreexpresando Pck1 S90A y comparando con los resultados obtenidos con las células control (transfectadas con el plásmido vacío) y con aquellas sobreexpresando Pck1 salvaje. En primer lugar, el estudio de la capacidad gluconeogénica en células HEK293T indicó que la sobreexpresión de Pck1 salvaje estimula significativamente la producción de glucosa ($2.6 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$, $p=0.0171$) en comparación con las células control, mientras que la sobreexpresión de

Pck1 S90A rindió células con un 31% menos capacidad gluconeogénica ($1.8 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mg}$, $n=3$, $p=0.023$) con respecto a las células que sobreexpresaron Pck1 salvaje y no produjo cambios significativos con respecto a las células control (Figura 3.50A). Sin embargo, la sobreexpresión del mutante S90A indujo un incremento significativo de la captación de glucosa en células HEK293T ($278 \pm 23 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) en comparación con las células control ($186 \pm 29 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, 1.5 veces, $p=0.0031$, $n=4$) y con las células que sobreexpresaron Pck1 salvaje ($210 \pm 21 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, 1.3 veces, $p=0.0048$, $n=4$) (Figura 3.50B). Estos resultados indican que la acetilación de Pck1 favorece la glicólisis y sugieren que S90 es relevante a la hora de definir la actividad Pck1.

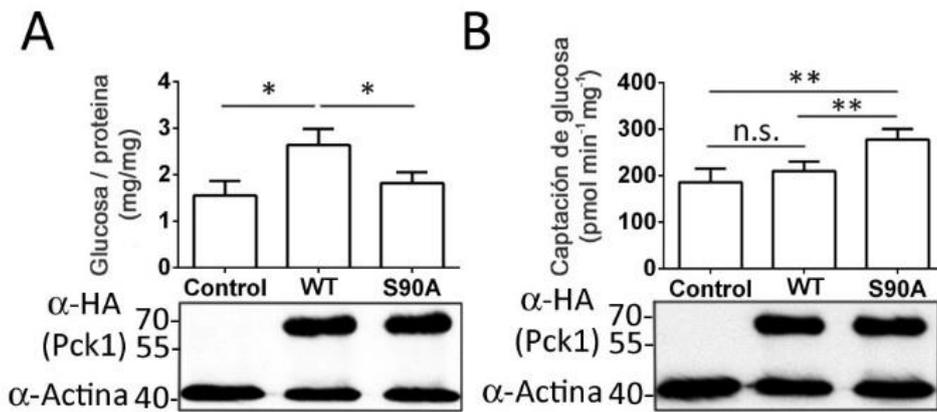


Figura 3.50. Efecto de la sobreexpresión de Pck1 salvaje (WT) y Pck1 p.S90A (S90A) sobre la capacidad gluconeogénica (A) y glicolítica (B) en células HEK293T. De manera independiente, se sobreexpresaron ambas construcciones de Pck1 (α -HA) y se determinó la capacidad de producir o de captar glucosa. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, n.s. = no significativo, $n=4$. El WB mostrado es representativo de cuatro experimentos independientes.

Finalmente, se generó en *E. coli* una variante de Pck1 que además de la sustitución K91AcK incluyó la sustitución S90E con el fin de imitar el efecto de una fosforilación. Se purificó la Pck1 p.S90E+K91AcK y se llevaron a cabo ensayos de deacetilación. SIRT1 fue capaz de deacetilar casi completamente Pck1 y recuperar sus propiedades cinéticas (Figura 3.51 y Tabla 3.17).

Tabla 3.17. Caracterización cinética de la Pck1 salvaje (WT) y las variantes Pck1 p.K91AcK (K91AcK) y Pck1 p.S90E+K91AcK (S90E+K91AcK) después del tratamiento con SIRT1 a 30°C.

PEP+GDP+CO ₂ → OAA + GTP						
	PEP			GDP		
	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ s ⁻¹)
WT	370±43	20±0.8	5.4x10 ⁴	89±16	17±1	1.9x10 ⁵
K91AcK	102±16	12±0.4	1.2x10 ⁵	21±6	11±0.7	5.9x10 ⁵
K91AcK+SIRT1*	95±13	11.4±0.4	1.2x10 ⁵	28±6	13±0.7	4.7x10 ⁵
S90E+K91AcK	102±26	9.4±0.6	9.2x10 ⁴	25±5	12±0.6	4.9x10 ⁵
S90E+K91AcK+SIRT1*	361±57	16±0.8	4.4x10 ⁴	67±10	15±0.8	2.2x10 ⁵

*Estas muestras fueron incubadas en presencia de SIRT1 y NAD⁺.

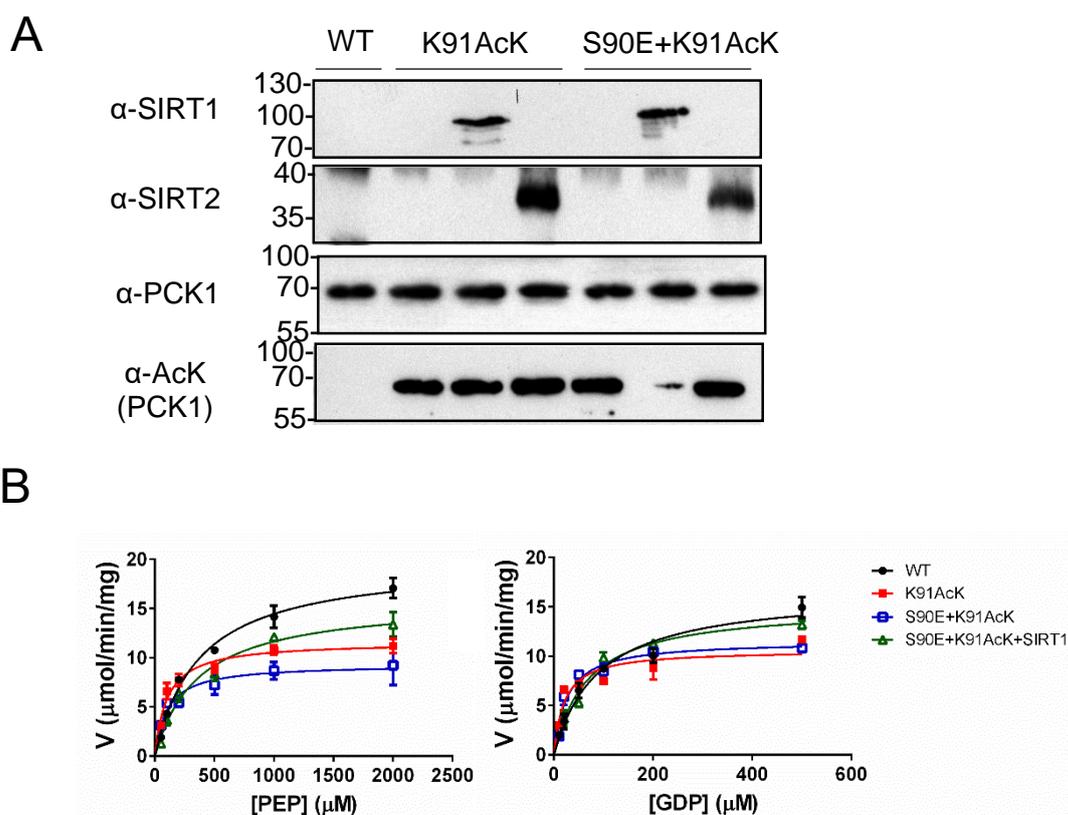


Figura 3.51. La deacetilación dependiente de SIRT1 de Pck1 p.S90A+K91AcK restaura las propiedades cinéticas de Pck1. (A) Tanto Pck1 p.K91AcK (K91AcK) como Pck1 p.S90E+K91AcK (S90E+K91AcK) (ambas 1.4 μM) (α-PCK1) fueron incubadas en presencia de SIRT1 (α-SIRT1) o SIRT2 (α-SIRT2) (0.35 μM cada una) y 0.5 mM NAD⁺. Como control la Pck1 fue tratada en presencia exclusiva de NAD⁺. El WB muestra que el tratamiento a 30°C y 2 horas en presencia de SIRT1 es capaz de deacetilar Pck1 y es representativo de dos experimentos independientes. Los números a la izquierda representan el peso molecular (kDa). **(B)** Representación gráfica de Michaelis-Menten de la Pck1 salvaje (WT), Pck1 p.K91AcK (K91AcK), Pck1 p.S90E+K91AcK (S90E+K91AcK) y Pck1 p.S90E+K91AcK tratada con SIRT1 (S90E+K91AcK+SIRT1) para los sustratos PEP y GDP.

Estos resultados en conjunto permiten identificar a GSK3 β como mediador de la fosforilación de Pck1 en condiciones de alta glucosa y sugieren que esta fosforilación conlleva la ubiquitinación y degradación de Pck1. Además, la fosforilación mediada por GSK3 β , favorece la deacetilación dependiente de SIRT1.

3.4. Efecto de la acetilación sobre las propiedades cinéticas de las isoformas Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas.

En el apartado 3.3, se analizaron los efectos de la acetilación sobre las propiedades cinéticas en Pck1 procedente de diversas especies tanto en cultivo celular como a partir de muestras de tejido de ratón. Estos resultados mostraron que la acetilación dificulta la reacción en el sentido gluconeogénico y favorece la reacción reversa. Con el fin de conocer si el mecanismo se extiende a otras especies mamíferas y teniendo en cuenta la diferencia en el nivel de acetilación de las isoformas porcinas salvaje y p.M139L (Figura 3.8), se analizaron las propiedades cinéticas de estas isoformas porcinas purificadas a partir de células HEK293T expuestas a alta y baja glucosa. La purificación se llevó a cabo utilizando construcciones basadas en el constructo pCMP23 (Tabla 2.5, página 54). En este caso (construcciones pCMP26 y pCMP27, Tabla 2.11, página 61), tanto la cola de histidinas como el epítipo myc se incluyeron en el extremo amino terminal. La purificación se llevó a cabo utilizando una columna de NTA-cobalto y dio lugar a una proteína con alto grado de pureza (Figura 3.52).

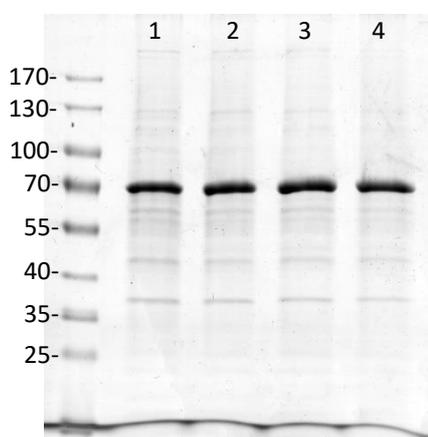


Figura 3.52. Purificación de las isoformas Pck1 y Pck1 p.M139L porcinas a partir de células HEK293T. Gel del 10% de poliacrilamida mostrando la Pck1 purificada a partir de células HEK293T expuestas a alta o baja glucosa. Las bandas a la altura de 70 kDa corresponden a la Pck1. Carril 1: Pck1 baja glucosa; carril 2: Pck1 alta glucosa; carril 3: Pck1 p.M139L baja glucosa, carril 4: Pck1 p.M139L alta glucosa. Los números a la izquierda representan el peso molecular (kDa).

Por medio de western blot se comprobó el nivel de acetilación de cada isoforma en cada condición y se cuantificó por densitometría (Figura 3.53). Como puede observarse en la Figura 3.53, tanto Pck1 como Pck1 p.M139L presentan niveles más elevados de acetilación en condiciones de alta glucosa (25 mM) en comparación con las proteínas purificadas a partir de células expuestas a baja glucosa (2.5 mM). En condiciones de alta

glucosa, Pck1 p.M139L mostró un nivel significativamente mayor (1.3 veces, $n = 2$, $p = 0.032$) de acetilación respecto a Pck1. En condiciones de baja glucosa, esta diferencia no fue significativa.

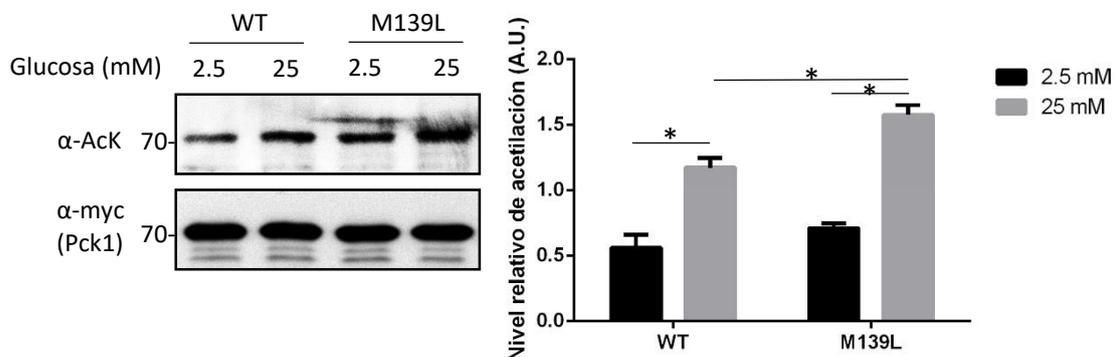


Figura 3.53. Nivel de acetilación de las isoformas Pck1 salvaje (WT) y Pck1 p.M139L (M139L) purificadas a partir de células HEK293T expuestas a baja (2.5 mM) o alta (25 mM) glucosa. El nivel de acetilación de las isoformas porcinas de Pck1 se determinó por densitometría a partir de la señal detectada utilizando un anticuerpo anti-acetil-lisina (α -AcK) y normalizando al contenido total de Pck1 (α -myc). A la derecha se representa gráficamente el nivel relativo de acetilación. A.U.= Unidades arbitrarias. * $p < 0.05$, $n = 2$.

El análisis cualitativo de la acetilación de lisinas por espectrometría de masas reveló acetilación en los residuos 91 y 316. No se observó que la isoforma Pck1 p.M139L presentase diferentes lisinas acetiladas en comparación con la isoforma salvaje, lo cual sugirió que las diferencias entre ambas podrían radicar en el nivel de acetilación y/o su susceptibilidad a ser acetiladas.

Finalmente, se estudiaron las propiedades cinéticas de las isoformas purificadas (Tabla 3.18). En el sentido gluconeogénico ($OAA \rightarrow PEP$) (Tabla 3.18A), Pck1 mostró una menor actividad (k_{cat}) (~20-25%) cuando se purificó de células HEK293T expuestas a altas concentraciones de glucosa, mientras que, en las mismas condiciones, este efecto fue menos acusado en la variante Pck1 p.M139L. En el sentido contrario de la reacción ($PEP \rightarrow OAA$) (Tabla 3.18B), tanto Pck1 como Pck1 p.M139L mostraron valores más bajos de K_m , y mayor afinidad, tanto para PEP como para GDP cuando se purificaron de células expuestas a alta concentración de glucosa. Este cambio incrementó ~2 veces la eficiencia catalítica para estos sustratos. Sin embargo, Pck1 p.M139L fue más activa (20%) en esta reacción para todos los sustratos en ambas condiciones de glucosa.

Igualmente, la Pck1 p.M139L purificada a partir de bajas concentraciones de glucosa mostró mayor afinidad por el sustrato PEP en comparación con la Pck1 salvaje. En general, el incremento de acetilación estimulado por el aumento de la concentración de glucosa en el medio rindió proteínas más eficaces en el sentido no gluconeogénico (PEP→OAA) mejorando las propiedades cinéticas para los sustratos PEP y GDP. Sin embargo, en condiciones de baja glucosa, Pck1 p.M139L mostró mejores propiedades cinéticas en el sentido anaplerótico (PEP→OAA) de la reacción. En conjunto, los resultados muestran que las diferencias más acusadas en las propiedades cinéticas de ambas isoformas se dan en bajas concentraciones de glucosa, donde la isoforma Pck1 p.M139L es más eficaz llevando a cabo la reacción no gluconeogénica.

Tabla 3.18. Caracterización cinética de la Pck1 salvaje y la variante Pck1 p.M139L (M139L) purificadas a partir de células HEK293T expuestas a distintas concentraciones de glucosa.					
Concentración de glucosa		2.5 mM		25 mM	
Sustrato	Parámetro	Salvaje	M139L	Salvaje	M139L
A) OAA+GTP-> PEP+GDP+CO₂					
OAA	<i>K_m</i> (μM)	37±4	33±4.5	28±5	37±5
	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	48±1.5	40±1.5	34±1.6	36±1.4
	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹s⁻¹)	1.3 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	1.2 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶
GTP	<i>K_m</i> (μM)	258±41	288±50	218±46	232±38
	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	44±2.7	41±2.9	35±2.8	37±2.3
	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹s⁻¹)	1.7 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁵
B) PEP+GDP+CO₂ -> OAA + GTP					
PEP	<i>K_m</i> (μM)	464±56	334±39	202±22	171±18
	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	14±0.8	17±0.7	13±0.5	15±0.5
	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹s⁻¹)	3 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	6 x 10 ⁴	9 x 10 ⁴
GDP	<i>K_m</i> (μM)	148±29	136±19	53±8	63±7
	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	14±1	16±0.9	12±0.5	14±0.5
	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹s⁻¹)	9 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁵
KHCO₃	<i>K_m</i> (mM)	20±3.5	22±4.5	27±7.5	29±6
	<i>k_{cat}</i> (s⁻¹)	15±1.2	17±1.6	16±1.3	18±1.8
	<i>k_{cat}/K_m</i> (M⁻¹s⁻¹)	7.5 x 10 ²	7.7 x 10 ²	6 x 10 ²	6 x 10 ²

4. Discusión

En mejora porcina, el descenso del contenido en tocino dorsal conlleva también el descenso del contenido en grasa intramuscular debido a su correlación negativa. Por ello, los esfuerzos en genética porcina deben ir destinados a un descenso en el contenido en tocino dorsal y un incremento del contenido en grasa intramuscular con el fin es incrementar la calidad de los productos cárnicos y el rendimiento de la canal. Un ejemplo de gen actuando en este sentido es el polimorfismo de *IGF2* porcino (Jeon et al., 1999; Van Laere et al., 2003; Nezer et al., 1999). Sin embargo, es necesario encontrar más marcadores que permitan trabajar en la misma dirección. En este sentido, la primera observación que llevó al estudio de posibles mutaciones en el gen de la *Pck1* fue el ratón transgénico (Hakimi et al., 2007) que sobreexpresa un 400% más de *Pck1* en músculo esquelético. Estos ratones muestran un incremento del tejido adiposo intramuscular y una disminución de los niveles de grasa subcutánea y visceral. Además, son más resistentes a las pruebas de esfuerzo físico, comen el doble que un ratón no modificado y, sin embargo, con el doble de longevidad. Por su papel central en el metabolismo de lípidos y glúcidos, *Pck1* se ha señalado como un claro gen candidato para modular los caracteres fenotípicos en cerdos (Wang et al., 2013). Con estas observaciones y como se ha visto con otros genes (Fujii et al., 1991; MacLennan et al., 1990), se utilizó un enfoque de biología comparada para buscar polimorfismos en el gen de la *Pck1* porcina que modificasen el contenido graso en el cerdo. Para ello, se estudiaron la región codificante y promotora del gen de la *Pck1* porcina en razas muy alejadas genéticamente como son la raza ibérica y la Piètrain. Se encontró una sustitución en el exón 4 del gen que codifica la *Pck1* porcina, concretamente en la posición 2456. La sustitución de adenina (A), que codifica metionina, a citosina (C), que codifica leucina, segregó de manera diferente entre las distintas razas que inicialmente se estudiaron (Figura 3.1). Además, el estudio en diversas razas de la presencia del alelo C indica que su frecuencia era mayor en razas más seleccionadas y que además la variabilidad está presente en todas ellas (Tabla 3.6).

Los caracteres cuantitativos definen parte importante del fenotipo y juegan un papel fundamental para comprender el desarrollo de tejidos (Wood et al., 2014) y

enfermedades (Plomin et al., 2009) así como para su aplicación en mejora animal (Dekkers, 2012) y de plantas (St.Clair, 2010). Se ha identificado que el carácter altura del ser humano está definido por más de 600 genes (Wood et al., 2014). En muchos casos los efectos de estos genes son insignificantes, pero en conjunto contribuyen a la hora de definir el fenotipo de los individuos. Pese a que los estudios de asociación se llevaron a cabo en una población reducida de 202 animales Du x LD/LW, se encontró asociación entre el polimorfismo c.A2456C de *Pck1* y los caracteres estudiados (Tabla 3.1), indicando que el alelo A, que codifica metionina, está fuertemente asociado al del fenotipo deseable para la mejora genética porcina, incrementando el contenido en grasa intramuscular y reduciendo la grasa subcutánea, como el ratón transgénico (Hakimi et al., 2007) que lleva a cabo un metabolismo de tipo oxidativo, mientras que el alelo C está asociado a un metabolismo de tipo glicolítico, incrementando la capacidad de retención de agua y mostrando un descenso más acusado del pH después de 24 horas. Para descartar que los efectos aditivos observados se debían a desequilibrio de ligamiento, se decidió estudiar ambas isoformas de *Pck1*. El análisis de las propiedades cinéticas de *Pck1* salvaje y de la variante p.M139L (Tabla 3.2) y de su actividad gluconeogénica y gliceroneogénica en células HEK293T (Figura 3.7) indican que la enzima salvaje es más activa en el sentido gluconeogénico de la reacción (OAA→PEP) mientras que la variante *Pck1* p.M139L es más activa (40-50%) en el sentido glicolítico/anaplerótico (PEP→OAA).

Recientemente, se ha publicado que la sobreexpresión de *Pck1* en músculo de cerdo incrementa el contenido en grasa intramuscular (Ren et al., 2017), lo que refuerza los resultados obtenidos en el presente trabajo y el papel de *Pck1* en la capacidad de definir el engrasamiento. Sin embargo, en este trabajo no se indica qué isoforma de *Pck1* se sobreexpresó (salvaje o M139L). Teniendo en cuenta el papel de *PCK1* en multitud de rutas metabólicas (Yang et al., 2009a) como la gluconeogénesis, lipogénesis y también en la regulación del ciclo de Krebs por medio de la anaplerosis y la cataplerosis (Hakimi et al., 2007; Owen et al., 2002), algunos autores han señalado que los cambios en la expresión o en la actividad enzimática de *Pck1*, pueden dar lugar a los resultados más

inesperados (She et al., 2000). Ciertos trabajos han mostrado la correlación entre la actividad PCK1 y el acúmulo de tejido adiposo (Franckhauser et al., 2002; Olswang et al., 2002; She et al., 2000), siendo la sobreexpresión de Pck1 en músculo de ratón el ejemplo más claro, donde además la sobreexpresión de Pck1 incrementa el metabolismo oxidativo e incluso la representación de las fibras musculares de tipo I (Hakimi et al., 2007). Además, a la vista de los resultados cinéticos (Tabla 3.2) y estructurales (Tabla 3.3), los nucleótidos GDP y GTP se muestran especialmente relevantes en este cambio de actividad como ya se ha señalado en trabajos previos (Holyoak et al., 2006; Yang et al., 2009a). Estos resultados no sólo indicarían cómo una sustitución en la Pck1 porcina es capaz de incrementar la capacidad glicolítica (Montal et al., 2015) sino que además estaría de acuerdo con el tipo de fibra muscular característico de las diversas razas porcinas (Liu et al., 2015).

El tipo de fibra muscular también es relevante para la obtención de productos cárnicos de calidad. Así, se ha observado que la sobreexpresión de Pgc1 α en ratones modifica el tipo de fibra muscular de tipo II (rápidas, glicolíticas) a tipo I (lentas, oxidativas) (Lin et al., 2002). Por ello, y por la capacidad de estimular expresión de Pck1 (Puigserver et al., 1998; Tontonoz et al., 1995), se estudió el polimorfismo c.T1378A de Pgc1 α (Kunej et al., 2005), que es el más estudiado de todos (Erkens et al., 2010). A diferencia del polimorfismo c.A2456C de Pck1 porcina y como se ha observado en otros trabajos previos (Erkens et al., 2009, 2010), no se encontró asociación entre los caracteres grasos y el polimorfismo c.T1378A de Pgc1 α (que produce un cambio C430S) (Tabla 3.7), pese a que se encontró variabilidad para dicho polimorfismo. Este resultado se podría deber al menor número de individuos homocigotos TT de la población objeto de estudio en comparación con otras poblaciones (Liu et al., 2011). En esa misma población (Liu et al., 2011), el polimorfismo c.T1378A está asociado a un mayor tamaño de fibra muscular (Liu et al., 2011), pero estos efectos no parecen ser directamente atribuibles a Pgc1 α (Takikita et al., 2010).

Parte de los efectos génicos son consecuencia de la existencia de efectos epistáticos entre los distintos genes (Kroymann and Mitchell-Olds, 2005; Mackay, 2013; Modjtahedi et al., 2015; Smemo et al., 2014). Teniendo en cuenta la importancia de PGC1 α y PCK1 como reguladores del metabolismo a distintos niveles, se estudiaron los efectos aditivos y epistático de las sustituciones c.A2456C de *Pck1* y c.T1378A de *Pgc1 α* . Este análisis mostró asociación para un 60 % de las interacciones epistáticas, más de lo que cabría esperar por mero azar (20 %). La presencia de la variante Pgc1 α p.C430S reforzó los efectos de la variante Pck1 p.M139L disminuyendo la calidad de la carne y dando lugar a una mayor exudación. Sin embargo, esta misma combinación dio lugar a un menor espesor de tocino dorsal y menor porcentaje de cortes ricos en tejido adiposo (panceta y tocino). El descenso en el nivel de tocino dorsal sería conveniente desde el punto de vista económico porque esos cortes son los menos valorados. No obstante, ninguna de las combinaciones alélicas de ambos genes se asoció a efectos positivos sobre la calidad de la carne y la conformación como sucede con el polimorfismo de *Pck1*. Esto es esperable de un regulador transcripcional que tiene efectos no sólo a través de PCK1 sino también a través de la regulación de la expresión de otros genes en otras rutas (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011; Finck and Kelly, 2006) e indica que es difícil que la selección pueda basarse en un único marcador cuando se persigue un determinado fenotipo.

Los efectos epistáticos observados son un ejemplo de cómo los polimorfismos son capaces de actuar en función del contexto genético (Mackay, 2013), aunque el tamaño muestral es relevante a la hora de evidenciar dichos cambios, especialmente cuando las frecuencias de uno de los genotipos son bajas. No obstante, el estudio de los mecanismos moleculares por los que actúa la sustitución C430S de Pgc1 α porcina indicó que la variante C430S indujo menor cantidad de mRNA y proteína PCK1 (Figura 3.11), mostró menor capacidad gluconeogénica (Figura 3.12) y fue más estable a lo largo del tiempo (Figura 3.13), hechos que resultaron paradójicos. Además, se observó una diferencia entre los niveles de inducción de mRNA de PCK1 por parte de Pgc1 α (2.4 veces más, Figura 3.10) y de la cantidad de proteína (20% más, Figura 3.11) que, aunque

concordarían con el incremento de la capacidad gluconeogénica (20%, Figura 3.12) podrían ser debidos al corto tiempo de vida media del mRNA de PCK1, 30 minutos (Tilghman et al., 1974). Se ha descrito también que la vida media de PGC1 α es corta, unos 20 minutos, y que el extremo carboxilo de la proteína es crítico para definir la estabilidad de la proteína (Sano et al., 2007). Además, se ha visto que una isoforma de PGC1 α generada por “splicing” (Zhang et al., 2009), NT-PGC1 α , expresa el extremo amino de la proteína que incrementa considerablemente su vida media en la célula y se encuentra principalmente en el citosol, en lugar de su localización habitual en el núcleo (Trausch-Azar et al., 2010). Sin embargo, este cambio de localización no fue el caso para ninguna de las isoformas porcinas (Figura 3.14).

A la vista de los resultados anteriores, se decidió profundizar en el estudio de las PTMs con el fin de encontrar diferencias entre las variantes de Pgc1 α . Las PTMs juegan un papel clave en la regulación del metabolismo (Nguyen et al., 2013; Oliveira et al., 2012; Ruan et al., 2013; Verdin and Ott, 2014) y PGC1 α está fuertemente regulado por distintas modificaciones de este tipo entre las que se incluyen la fosforilación (Jäger et al., 2007), la acetilación (Dominy et al., 2012) y la O-glicosilación (O-GlcNAc) (Housley et al., 2009). En algunos casos estas modificaciones parecen tener efectos contrapuestos como sucede con la fosforilación (Jäger et al., 2007; Li et al., 2007) o con la acetilación (Dominy et al., 2012; Higashida et al., 2013) que indican que posiblemente una misma modificación puede tener efectos muy distintos en función del tejido y del residuo afectado (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011). La modificación por O-GlcNAc incrementa la estabilidad de PGC1 α en células a través del complejo OGT/HIF1 (Ruan et al., 2012) y explicaría que el incremento de estabilidad de la variante C430S se debería al incremento de los niveles de glicosilación (O-GlcNAc) (Figura 3.16). Se ha descrito que la S333 de PGC1 α está O-glicosilada (Housley et al., 2009) y otros autores han apuntado la posibilidad de que otros residuos puedan estarlo también (Ruan et al., 2012). La O-glicosilación de tipo O-GlcNAc afecta a serinas y treoninas (Slawson et al., 2010) de proteínas presentes en el citosol y en el núcleo. El residuo 430 se encuentra próximo al sitio de interacción con PPAR γ (Housley et al., 2009), un promotor de la expresión de

PCK1 (Tontonoz et al., 1995), y los resultados mostraron que la variante p.C430S presentaba una interacción más débil que la de Pgc1 α salvaje. Esto permite concluir que, aunque la O-glicosilación incrementa la estabilidad de la variante p.C430S, esta misma PTM estaría asociada a una menor actividad transcripcional de esta variante de Pgc1 α a través de, al menos, PPAR γ . De este modo se podría considerar que el aumento del nivel de O-glicosilación como consecuencia de la sustitución C430S afectaría negativamente a la interacción entre PPAR γ y PGC1 α .

La variante Pck1 p.M139L es también ejemplo de cómo una sustitución modula los niveles de una determinada PTM. En este caso, la variante Pck1 p.M139L mostró un nivel mayor de acetilación que la Pck1 salvaje (Figura 3.8). Se ha observado que PCK1 se acetila en células y tejidos en distintos organismos (Lin et al., 2009; Zhao et al., 2010). En un trabajo, la acetilación de PCK1 se ha asociado también a su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma (Jiang et al., 2011), pero el incremento de acetilación (32%) no produjo un nivel semejante de degradación (19%) (Figura 3.8). En otro trabajo en *S. cerevisiae*, se describe que la acetilación de Pck1p es un mecanismo de regulación de la actividad (Lin et al., 2009). Además, ciertos datos preliminares sugirieron que la sobreexpresión de p300 no afectaba la estabilidad de la proteína (datos no publicados). Estos datos y el hecho de que la p300 ejerce su función acetil-transferasa en el núcleo (Sebti et al., 2014; Shi et al., 2009) y que la deacetilación *in vitro* de proteínas plegadas, como PCK1, dependiente de sirtuinas plantea dificultades (Knyphausen et al., 2016), llevaron a estudiar los mecanismos de acetilación y deacetilación de Pck1 y su implicación en la actividad de la enzima, usando como modelo la Pck1 de rata, que ha sido ampliamente estudiada y de la que se conoce perfectamente su estructura, mecanismo de catálisis y su cinética (Cui et al., 2017; Johnson and Holyoak, 2010, 2012; Johnson et al., 2016).

En esta parte del trabajo (véase apartado 3.3, página 129), se muestra cómo la acetilación reversible de Pck1 cambia la actividad de gluconeogénica a anaplerótica y viceversa. En condiciones de alta energía la acetilación dependiente de p300 favorece la

actividad anaplerótica de Pck1. En estas condiciones, la acetilación de la lisina 91 mejora la eficiencia catalítica para los sustratos PEP y GDP y al mismo tiempo vuelve la reacción gluconeogénica desfavorable. En condiciones de baja energía, la deacetilación dependiente de SIRT1 es capaz de restaurar las propiedades gluconeogénicas de la Pck1. A su vez, en condiciones de alta glucosa, la fosforilación de Pck1 es dependiente de GSK3 β y favorece la ubiquitinación y degradación de Pck1. Además, esta fosforilación adyacente a la lisina 91 favorece la deacetilación de la Pck1 en condiciones de baja energía. En conjunto estos resultados muestran cómo la acetilación desencadena la reacción anaplerótica de Pck1 y que la interacción entre acetilación, fosforilación y ubiquitinación controla la Pck1 y su papel en el metabolismo central (Figura 4.1).

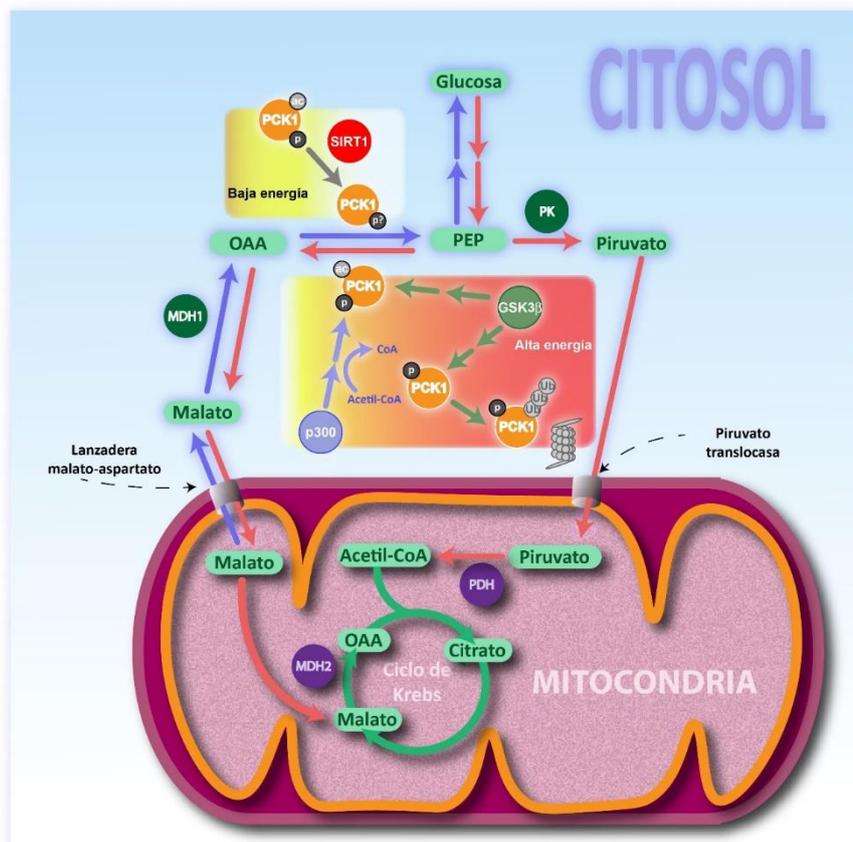


Figura 4.1. Representación gráfica del papel de la acetilación y fosforilación de PCK1 dentro de una célula gluconeogénica. Las flechas azules indican la ruta gluconeogénica y las rojas la glicolítica. Distintos sustratos aparecen representados. OAA, Oxaloacetato; PEP, Fosfoenolpiruvato. SIRT1, Sirtuina 1; (ac/p) PCK1, Fosfoenolpiruvato carboxikinasa citosólica (acetilada/fosforilada); MDH1/2, malato deshidrogenasa citosólica/mitocondrial; PK, Piruvato kinasa; PDH, Piruvato deshidrogenasa; GSK3 β , Glicógeno Sintasa Kinasa 3 β . Para facilitar la visualización en la ruta gluconeogénica, la conversión de piruvato a OAA por la piruvato carboxilasa y su consiguiente transformación a malato por la MDH2, no están representadas.

La observación de que los niveles de PCK1 endógena se mantienen constantes durante 24 horas in células gluconeogénicas expuestas a diferentes concentraciones de glucosa (Figura 3.18, Figura 3.19 y Figura 3.20) es consistente con la larga vida media de esta enzima (Hopgood et al., 1973) y apoyan el posible papel de la PCK1 más allá de la gluconeogénesis (Burgess et al., 2007; She et al., 2000, 2003). Además, otros homólogos de Pck1 en levaduras y bacterias han mostrado capacidad para llevar a cabo la reacción reversa (PEP→OAA) (Fuhrer et al., 2005; Lin et al., 2009; Wang et al., 2010; Zelle et al., 2010), cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono. En este sentido, tanto la proteína endógena como la Pck1 de rata sobreexpresada y purificada a partir de células HEK293T mostró una actividad reducida en la ruta gluconeogénica (OAA→PEP) en condiciones de alta glucosa y de actividad p300 (Figura 3.21 y Figura 3.22). Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito el papel de la acetilación en la degradación de PCK1 (Jiang et al., 2011), pero sin embargo, otro trabajo demostró que la acetilación de Pck1p en *S. cerevisiae* estimula la actividad gluconeogénica (Lin et al., 2009). Además, los datos cinéticos de la Pck1 purificada, mostraron un descenso de K_m y un incremento de la eficiencia catalítica de la enzima purificada en condiciones de alta glucosa para los sustratos PEP y GDP (Tabla 3.10), condiciones en las que la Pck1 está más acetilada (Tabla 3.8). A la vista de los resultados obtenidos y los trabajos citados, se consideró reevaluar el papel de la acetilación en la regulación de la actividad de Pck1 favoreciendo la ruta anaplerótica. Así, se muestra que la acetilación de la lisina 91 de Pck1 mejora las propiedades cinéticas para los sustratos PEP y GDP (Tabla 3.12). La lisina 91 se encuentra en el “loop” R de Pck1 que resulta esencial para la catálisis (Johnson et al., 2016) y el cambio en la dinámica de los “loops” R y Ω podría explicar el cambio cinético (Figura 3.32 y Figura 3.33). Este cambio en la actividad es reversible. Así, la SIRT1 restaura las propiedades gluconeogénicas de la enzima (Figura 3.24 y Tabla 3.8) y controla el metabolismo operando a dos niveles: por un lado modula la expresión de genes gluconeogénicos (Caton et al., 2011; Rodgers and Puigserver, 2007; Rodgers et al., 2005) y por otro lado, los resultados de este trabajo muestran que puede actuar directamente deacetilando PCK1 (Tabla 3.17, Figura 3.34, Figura 3.35, Figura 3.37 y Figura 3.38). De acuerdo con los experimentos en células, el análisis de las propiedades cinéticas y del

nivel de acetilación de la Pck1 a partir de tejidos gluconeogénicos de ratón mostró que la Pck1 está más acetilada y presenta una capacidad gluconeogénica reducida en animales SIRT1^{-/-}, pero sin embargo muestra una mayor eficiencia en el sentido anaplerótico de la reacción (PEP→OAA) (Tabla 3.15, Tabla 3.16, Figura 3.40, Figura 3.41 y Figura 3.42). De acuerdo con esto, la hiperacetilación de Pck1 conlleva un incremento de la glicólisis y de la entrada de metabolitos al ciclo de Krebs (Figura 3.50B). Además, se ha observado que estos ratones SIRT1^{-/-} presentan niveles más bajos de glucosa en sangre cuando son expuestos a una dieta alta en grasas (Price et al., 2012). En otros trabajos también se ha observado que el incremento en la actividad del ciclo de Krebs (Satapati et al., 2012; Sunny et al., 2011) está presente en animales deficientes en SIRT1 (Purushotham et al., 2009). Todas estas observaciones indican que la conversión de PEP a OAA, la reacción reversa de PCK1, es posible *in vivo* y refuerzan que el papel de la PCK1 que va más allá de la gluconeogénesis.

Los efectos de la acetilación sobre la actividad Pck1 permitieron estudiar con más detalle la variante p.M139L de la Pck1 porcina. Como se ha dicho anteriormente, ciertos datos podrían indicar que la acetilación no está detrás del descenso de la estabilidad de Pck1 en la célula (Figura 3.9 y otros datos preliminares). Por tanto, los resultados de la sustitución K14A y el incremento de estabilidad (Figura 3.8) podrían ser consecuencia de un cambio en la estructura del extremo N-terminal de Pck1 (Chen et al., 2017). Este hecho contrasta con la ausencia de acetilación en la lisina 14 en los experimentos de MS (Tabla 3.8 y Tabla 3.9). Sin embargo, los datos obtenidos sobre los mecanismos que regulan la actividad de PCK1 por acetilación sugieren que la sustitución p.M139L tendría un papel clave para definir el tipo de metabolismo en el cerdo. Así pues, los datos cinéticos de la Pck1 salvaje y Pck1 p.M139L porcinas, purificadas a partir de células HEK293T, indican que la variante p.M139L sería más eficaz en su actividad en sentido glicolítico en condiciones de baja glucosa (Tabla 3.18) y son esas condiciones las que marcarían la diferencia dado que los animales atraviesan periodos de ayuno a lo largo del día. Es decir, en general, una mayor acetilación indicaría un mayor grado de metabolismo glicolítico que sería el propio de animales de raza Piètrain donde

predominan las fibras musculares de tipo II, y donde se detectaron niveles más bajos de pH y menor capacidad de retención de agua (Tabla 3.1) lo que estaría relacionado, entre otros factores, con un incremento de la actividad Pck1 en el sentido de PEP a OAA. Estos resultados muestran a la variante p.M139L como un ejemplo biológico de modulación del metabolismo.

Se ha señalado que el desencadenante de la reacción reversible de Pck1 es la disponibilidad de nutrientes, y especialmente la ratio GTP/GDP (Sullivan and Holyoak, 2008). Sin embargo, esta ratio es de alrededor de 5 en condiciones de baja glucosa mientras que en condiciones de alta glucosa esta ratio es aproximadamente 25 (Detimary et al., 1996). La concentración de GDP y GTP se encuentran alrededor de 36 y 305 μM , respectivamente, en la especie humana (Traut, 1994). Esas mismas concentraciones en células iBMK cultivadas en DMEM son de 31 y 677 μM , respectivamente (Park et al., 2016). En este escenario, el descenso del valor de K_m de 70-100 μM a 15-40 μM debido a la acetilación (Tabla 3.10, Tabla 3.12 y Tabla 3.16) podría ser una estrategia para favorecer la ruta anaplerótica que depende de GDP. Al contrario, en condiciones de baja glucosa, donde la ratio GTP/GDP es 5, incrementar el valor de K_m para GDP sería igualmente útil para favorecer la ruta gluconeogénica. La ecuación de Michaelis-Menten permite obtener la velocidad de una determinada reacción teniendo en cuenta la concentración de sustrato y los parámetros cinéticos:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Aplicando esta ecuación y considerando $[\text{GDP}] = 31 \mu\text{M}$ y las constantes cinéticas para ese sustrato de las enzimas Pck1 salvaje y variante K91AcK (Tabla 3.12), se obtiene que $v_{K91AcK} = 9.1$ y $v_{Pck1} = 4.6 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Otros sustratos como PEP se encuentran en concentraciones bastante estables de entre 12 y 19 μM en el citosol (Park et al., 2016; Zupke et al., 1995) mientras que la inestabilidad del OAA impide una estimación clara de la concentración real (2-61 μM) (Park et al., 2016; Zupke et al., 1995). Para el sustrato PEP, aplicando los datos cinéticos del párrafo anterior y considerando $[\text{PEP}] = 16 \mu\text{M}$, se obtiene $v_{K91AcK} = 2.3$ y $v_{Pck1} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. En ambos casos se observa que la

reacción anaplerótica es más rápida en el caso de la enzima acetilada. Finalmente, en el caso del sustrato CO₂, las concentraciones celulares se encuentran alrededor de 20 mM en sangre (Kumar and Karon, 2008), de 10 mM en músculo y de 13.9 mM en hígado (Schwab et al., 1989).

En condiciones de alta energía, la acetilación incrementa la actividad de las enzimas malato deshidrogenasa citosólica (MDH1) (Kim et al., 2012; Zhao et al., 2010) y mitocondrial (MDH2) (Yang et al., 2015) que facilitarían la incorporación a la mitocondria del OAA generado por la Pck1 en esas mismas condiciones a través de la lanzadera malato-aspartato (Figura 4.1). Además, teniendo en cuenta el papel de la PCK2, que aunque complementario, no es redundante al de PCK1 (Méndez-Lucas et al., 2013) y que PCK2 genera PEP que es exportado al citosol a través de un transportador (Stark et al., 2009), ambas enzimas (PCK1 y PCK2) trabajarían de manera coordinada para regular la homeostasis de metabolitos dentro y fuera de la mitocondria en tejidos gluconeogénicos.

Aunque la fosforilación de Pck1 ha sido descrita por varios autores (Bian et al., 2014; Demirkan et al., 2011; Grimsrud et al., 2012; Lundby et al., 2012; Parker et al., 2015; Robles et al., 2017; Wilson-Grady et al., 2013), su papel biológico es totalmente desconocido. Los resultados de este trabajo muestran que GSK3 β es mediadora de la fosforilación de Pck1 (Figura 3.44 y Figura 3.45) que a su vez favorece la ubiquitinación y posterior degradación de la enzima (Figura 3.47, Figura 3.48 y Figura 3.49) en condiciones de alta glucosa. Estos resultados también indican un papel dual de GSK3 β en la regulación de la actividad Pck1 modificando su estabilidad y sus niveles en la célula pero además, reprime la expresión del gen *Pck1* (Horike et al., 2008). Por medio de estudios bioquímicos se ha demostrado que la fosforilación de la serina 90, adyacente a la lisina 91, es crítica para la estabilidad de Pck1 (Figura 3.49 y Figura 3.50) y sugiere una interacción entre la acetilación y la fosforilación de Pck1. Como se ha mencionado en varias ocasiones, un trabajo previo ha propuesto que la acetilación dependiente de glucosa y mediada por p300 promueve la degradación de Pck1 (Jiang et al., 2011). En

ese mismo estudio (Jiang et al., 2011), la deacetilación dependiente de SIRT2 rescata PCK1 de la degradación. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no muestran un descenso de los niveles de Pck1 como consecuencia de un incremento del nivel de glucosa (Figura 3.18, Figura 3.19 y Figura 3.20) ni del nivel de p300 (Figura 3.25B). A pesar de que en células HEK293T SIRT2 deacetila Pck1, no es el caso en células HepG2 (Figura 3.37). No obstante, se ha observado que SIRT2 favorece la fosforilación de GSK3 β y su consiguiente inhibición (Moscardó et al., 2015; Si et al., 2013) a través de AKT (Chen et al., 2013a), sugiriendo que los efectos protectores de SIRT2 sobre Pck1 (Jiang et al., 2011) podrían ser indirectos. Tanto la ubiquitinación como la acetilación se produce principalmente en lisinas. Curiosamente, se observó que residuos que eran acetilados, como las lisinas 91, 71 (Zhao et al., 2010) ó 124 (Weinert et al., 2013), también eran susceptibles de ser ubiquitinados (Wagner et al., 2012). Esto sugiere un mecanismo competitivo entre la acetilación y la ubiquitinación de Pck1, como se ha observado ya en otras proteínas (Grönroos et al., 2002; Li et al., 2002; Min et al., 2010; Tang et al., 2013). El hecho de que la fosforilación y la degradación se den en condiciones de alta glucosa, pero al mismo tiempo los niveles de Pck1 se mantienen constantes independientemente de la concentración de glucosa resulta incongruente. Si bien es cierto que el tiempo de vida media del mRNA de Pck1 es corto, de unos 30 minutos, (Granner et al., 1983; Hod and Hanson, 1988; Tilghman et al., 1974) y que en células es capaz de caer al 30% con respecto al tiempo inicial después de 3 horas (Shao et al., 2005), estudios realizados *in vivo* muestran que los niveles de Pck1 se mantienen constantes durante al menos 2 horas de continuo estímulo energético (Tilghman et al., 1974), que se explicaría gracias a la relativa larga vida media de la proteína (6-8, hasta 20 horas) (Hopgood et al., 1973). Además, se observa que, aunque inicialmente el estímulo energético disminuye los niveles de mRNA de PCK1 drásticamente, después de 8 horas estos niveles se encuentran al 60% de los observados en el tiempo inicial y alcanzan el máximo después de 16 horas de estímulo. Estas observaciones y los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que la fosforilación responde lentamente al estímulo de nutrientes y da tiempo a la acetilación a proteger la enzima compitiendo por los sitios de ubiquitinación. Tal y como se ha observado previamente (Knyphausen

et al., 2016), la deacetilación completa de la Pck1 recombinante acetilada no fue posible (Figura 3.42). Sin embargo, estos mismos autores fueron capaces de hacerlo incorporando en la región próxima a la lisina acetilada una secuencia de una proteína que se deacetila con facilidad y que incluía ácido glutámico. La sustitución S90E imitaría el efecto de la fosforilación por lo que se pudo conseguir la deacetilación completa de la variante S90E+K91AcK restaurando las propiedades cinéticas de la Pck1 (Figura 3.51 y Tabla 3.17) lo que sugiere que la fosforilación tiene un claro papel de en la deacetilación de Pck1.

El uso de herramientas que combinan la genética y la biología molecular permiten conocer en profundidad cuáles son los cambios y cuáles son los mecanismos por los que algunos polimorfismos pueden actuar y son capaces de aportar información para los programas de mejora animal. Al mismo tiempo, las variantes Pck1 p.M139L y Pgc1 α p.C430S son un ejemplo biológico de cómo es posible modificar la actividad Pck1 y el metabolismo energético en especies mamíferas a través de las modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones son capaces de estimular la actividad anaplerótica de la enzima Pck1, como sucede con la acetilación, o su estabilidad, como sucede con la fosforilación y la ubiquitinación, indicando que el metabolismo energético está sujeto al control de Pck1 a través de estas modificaciones lo que puede ayudar a entender su papel en procesos metabólicos y fisiológicos como la infiltración grasa (Hakimi et al., 2007) o en procesos patológicos como la obesidad y diabetes (Beale et al., 2004, 2007; Gómez-Valadés et al., 2008) o el cáncer (Montal et al., 2015).

5. Conclusiones

En el presente trabajo se muestran diversos mecanismos que regulan la actividad PCK1 a través de modificaciones post-traduccionales y su aplicación directa a la industria porcina. A continuación, se presentan las conclusiones del mismo.

- El polimorfismo c.A2456C del gen de la *Pck1* porcina modifica la actividad y estabilidad del enzima y el contenido graso en el cerdo, reduciendo el tocino dorsal e incrementando la grasa intramuscular. Este polimorfismo favorece la actividad en sentido glicolítico/anaplerótico.
- El polimorfismo c.A2456C es potencialmente interesante en los programas de selección centrados en la mejora de la calidad de carne de cerdo.
- La glicosilación regula la actividad y expresión de PCK1 a través de Pgc1 α de forma paradójica: la O-glicosilación dependiente de O-GT es capaz de incrementar la vida media de Pgc1 α porcina en detrimento de su actividad transcripcional y modifica la expresión de PCK1.
- El polimorfismo c.T1378A de Pgc1 α porcino no tiene efectos aditivos directos sobre los caracteres de la población estudiada, pero sí se ha observado un efecto epistático con el polimorfismo c.A2456C de la *Pck1*.
- La acetilación reversible hace de puente entre la capacidad gluconeogénica y anaplerótica de Pck1. Está mediada por la acetil-transferasa p300 y por la deacetilasa SIRT1 y es dependiente del estado energético de la célula.
- La fosforilación de Pck1, mediada por GSK3 β , ayuda a regular la proporción de Pck1 acetilada presente en la célula bien favoreciendo la degradación de proteína no acetilada o favoreciendo su deacetilación.
- Un mecanismo de competición entre ubiquitinación y acetilación por el control de lisinas expuestas controla la estabilidad y actividad de Pck1.
- Las modificaciones post-traduccionales actúan como un sensor que modula la actividad y estabilidad de Pck1 y el metabolismo celular en respuesta a los cambios energéticos.

Publicaciones del autor

Publicaciones relacionadas con el presente trabajo:

Latorre, P., Baeza, J., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., Wu, L.E., Sinclair, D.A., López-Buesa, P., Carrodegua, J.A., Denu, J.M. Dynamic acetylation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase toggles enzyme activity between gluconeogenic and anaplerotic reactions. *Mol. Cell* (segunda revisión).

Latorre, P., Varona, L., Burgos, C., Carrodegua, J.A., López-Buesa, P. (2017). O-GlcNAcylation mediates the control of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase activity via Pgc1 α . *PLoS One* 12 (6): e0179988.

Latorre, P., Burgos, C., Hidalgo, J., Varona, L., Carrodegua, J.A., and López-Buesa, P. (2016). c.A2456C-substitution in Pck1 changes the enzyme kinetic and functional properties modifying fat distribution in pigs. *Sci. Rep.* 6, 19617.

Otras publicaciones del autor:

Burgos, C., Latorre, P., and López-Buesa, P. (2016). The effects of chromium picolinate and simvastatin on pig serum cholesterol contents in swine muscular and adipose tissues. *Livest. Sci.* 185, 74–78.

Escós, M., Latorre, P., Hidalgo, J., Hurtado-Guerrero, R., Carrodegua, J.A., and López-Buesa, P. (2016). Kinetic and functional properties of human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochem. Biophys. Reports* 7, 124–129.

Hidalgo, J., Latorre, P., Carrodegua, J.A., Velázquez-Campoy, A., Sancho, J., and López-Buesa, P. (2016). Inhibition of pig phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzymes by 3-Mercaptopicolinic acid and novel inhibitors. *PLoS One* 11 (7): e015900.

Nelo-Bazan, M.A., Latorre, P., Bolado-Carrancio, A., Perez-Campo, F.M., Echenique-Robba, P., Rodriguez-Rey, J.C., and Carrodegua, J.A. (2016). Early growth response 1 (EGR-1) is a transcriptional regulator of mitochondrial carrier homolog 1 (MTCH 1)/presenilin 1-associated protein (PSAP). *Gene* 578, 52–62.

Burgos, C., Latorre, P., Altarriba, J., Carrodegua, J.A., Varona, L., and López-Buesa, P. (2015). Allelic frequencies of NR6A1 and VRTN, two genes that affect vertebrae number in diverse pig breeds: A study of the effects of the VRTN insertion on phenotypic traits of a Duroc x Landrace-Large White cross. *Meat Sci.* 100, 150–155.

Bibliografía

- Adams, D.R., Yuan, H., Holyoak, T., Aaraj, K.H., Hakimi, P., Markello, T.C., Wolfe, L.A., Vilboux, T., Burton, B.K., Fajardo, K.F., et al. (2014). Three rare diseases in one Sib pair: RAI1, PCK1, GRIN2B mutations associated with Smith-Magenis Syndrome, cytosolic PEPCK deficiency and NMDA receptor glutamate insensitivity. *Mol. Genet. Metab.* *113*, 161–170.
- Alvarez-Castro, J.M., and Carlborg, O. (2007). A Unified Model for Functional and Statistical Epistasis and Its Application in Quantitative Trait Loci Analysis. *Genetics* *176*, 1151–1167.
- Arnold, K.M., Lee, S., and Denu, J.M. (2011). Processing mechanism and substrate selectivity of the core NuA4 histone acetyltransferase complex. *Biochemistry* *50*, 727–737.
- Badke, Y.M., Bates, R.O., Ernst, C.W., Fix, J., and Steibel, J.P. (2014). Accuracy of estimation of genomic breeding values in pigs using low-density genotypes and imputation. *G3 (Bethesda)*. *4*, 623–631.
- Baeza, J., Dowell, J.A., Smallegan, M.J., Fan, J., Amador-Noguez, D., Khan, Z., and Denu, J.M. (2014). Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. *J. Biol. Chem.* *289*, 21326–21338.
- Baeza, J., Smallegan, M.J., and Denu, J.M. (2015). Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation. *ACS Chem. Biol.* *10*, 122–128.
- Beale, E.G., Hammer, R.E., Antoine, B., and Forest, C. (2004). Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene. *Trends Endocrinol. Metab.* *15*, 129–135.
- Beale, E.G., Harvey, B.J., and Forest, C. (2007). PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes. *Cell Biochem. Biophys.* *48*, 89–95.
- Beurel, E., Grieco, S.F., and Jope, R.S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* *148*, 114–131.
- Bian, Y., Song, C., Cheng, K., Dong, M., Wang, F., Huang, J., Sun, D., Wang, L., Ye, M., and Zou, H. (2014). An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome. *J. Proteomics* *96*, 253–262.
- Birchwood Genetics (2011). Birchwood bulletin Winter 2011-2012.
- Bordone, L., and Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 298–305.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* *303*, 2011–2015.
- Burgess, S.C., He, T., Yan, Z., Lindner, J., Sherry, A.D., Malloy, C.R., Browning, J., and Magnuson, M.A. (2007). Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Does Not Solely Control the Rate of Hepatic Gluconeogenesis in the Intact Mouse Liver. *Cell Metab.* *5*, 313–320.
- Burgos, C., Galve, A., Moreno, C., Altarriba, J., Reina, R., García, C., and López-Buesa, P.

- (2012). The effects of two alleles of IGF2 on fat content in pig carcasses and pork. *Meat Sci.* *90*, 309–313.
- Cannata, S., Engle, T., Moeller, S., Zerby, H., Bass, P., and Belk, K. (2009). Intramuscular fat and sensory properties of pork loin. *Ital. J. Anim. Sci.* *8*, 483–485.
- Carlson, G.M., and Holyoak, T. (2009). Structural insights into the mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. *J. Biol. Chem.* *284*, 27037–27041.
- Carrodeguas, J.A., Burgos, C., Moreno, C., Sánchez, A.C., Ventanas, S., Tarrafeta, L., Barcelona, J.A., López, M.O., Oria, R., and López-Buesa, P. (2005). Incidence in diverse pig populations of an IGF2 mutation with potential influence on meat quality and quantity: An assay based on real time PCR (RT-PCR). *Meat Sci.* *71*, 577–582.
- Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M., et al. (2012). AMBER 12.
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Hakimi, P., Xu, C., Massillon, D., Hanson, R.W., et al. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J. Biol. Chem.* *280*, 33873–33884.
- Caton, P.W., Nayuni, N.K., Khan, N.Q., Wood, E.G., and Corder, R. (2011). Fructose induces gluconeogenesis and lipogenesis through a SIRT1-dependent mechanism. *J. Endocrinol.* *208*, 273–283.
- Chakravarty, K., and Hanson, R.W. (2007). Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase c gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c. *Nutr. Rev.* *65*, S47–S56.
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., and Hanson, R.W. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *40*, 129–154.
- Chang, H.C., and Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 138–145.
- Chen, J., Chan, A.W.H., To, K.F., Chen, W., Zhang, Z., Ren, J., Song, C., Cheung, Y.S., Lai, P.B.S., Cheng, S.H., et al. (2013a). SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling. *Hepatology* *57*, 2287–2298.
- Chen, S.-J., Wu, X., Wadas, B., Oh, J.-H., and Varshavsky, A. (2017). An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes. *Science* (80-). *355*, eaal3655.
- Chen, Y., Mu, P., He, S., Tang, X., Guo, X., Li, H., Xu, H., Woo, S.L., Qian, X., Zeng, L., et al. (2013b). Gly482Ser mutation impairs the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α on decreasing fat deposition and stimulating phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in hepatocytes. *Nutr. Res.* *33*, 332–339.
- Childers, M.C., and Daggett, V. (2017). Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. *Mol. Syst. Des. Eng.* *2*, 9–33.
- Cui, D.S., Broom, A., McLeod, M.J., Meiering, E.M., and Holyoak, T. (2017). Asymmetric anchoring is required for efficient Ω -loop opening and closing in cytosolic

- phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemistry* 56, 2106–2115.
- Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* 98, 10089.
- Dekkers, J. (2012). Application of Genomics Tools to Animal Breeding. *Curr. Genomics* 13, 207–212.
- Demirkan, G., Yu, K., Boylan, J.M., Salomon, A.R., and Gruppuso, P.A. (2011). Phosphoproteomic profiling of in vivo signaling in liver by the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). *PLoS One* 6.
- Detimary, P., Van den Berghe, G., and Henquin, J.C. (1996). Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 271, 20559–20565.
- Dodson, M. V., Hausman, G.J., Guan, L., Du, M., Rasmussen, T.P., Poulos, S.P., Mir, P., Bergen, W.G., Fernyhough, M.E., McFarland, D.C., et al. (2010). Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 691–699.
- DOJT (2016). Noticias Denominación de Origen Jamón de Teruel.
- Dominy, J.E., Lee, Y., Jedrychowski, M.P., Chim, H., Jurczak, M.J., Camporez, J.P., Ruan, H. Bin, Feldman, J., Pierce, K., Mostoslavsky, R., et al. (2012). The Deacetylase Sirt6 Activates the Acetyltransferase GCN5 and Suppresses Hepatic Gluconeogenesis. *Mol. Cell* 48, 900–913.
- Dong, Y., Zhang, H., Wang, X., Feng, Q., Chen, X., and Su, Q. (2009). A Leu184Val polymorphism in PCK1 gene is associated with type 2 diabetes in Eastern Chinese population with BMI<23 kg/m². *Diabetes Res. Clin. Pract.* 83, 227–232.
- Driedzic, W.R., Clow, K. a, Short, C.E., and Ewart, K.V. (2006). Glycerol production in rainbow smelt (*Osmerus mordax*) may be triggered by low temperature alone and is associated with the activation of glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol-3-phosphatase. *J. Exp. Biol.* 209, 1016–1023.
- Duong, D.T., Waltner-Law, M.E., Sears, R., Sealy, L., and Granner, D.K. (2002). Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277, 32234–32242.
- Erkens, T., Rohrer, G.A., Van Zeveren, A., and Peelman, L.J. (2009). SNP detection in the porcine PPARGC1A promoter region and 3'UTR, and an association study in a Landrace-Duroc-Large White population. *Czech J. Anim. Sci.* 54, 408–416.
- Erkens, T., De Smet, S., Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Buys, N., Van Zeveren, A., and Peelman, L.J. (2010). Association analysis of PPARGC1A mutations with meat quality parameters in a commercial hybrid pig population. *Czech J. Anim. Sci.* 55, 200–208.
- Falconer, D.S., and Mackay, T.F.C. (1996a). Variance. In *Introduction to Quantitative Genetics* 4th edition1, (Pearson), pp. 122–144.
- Falconer, D.S., and Mackay, T.F.C. (1996b). Changes of gene frequency. In *Introduction to Quantitative Genetics* 4th Edition, (Pearson), pp. 23–47.
- Falconer, D.S., and Mackay, T.F.C. (1996c). Small populations II: Less simplified

- conditions. In *Introduction to Quantitative Genetics 4th edition*1, (Pearson), pp. 65–81.
- Fan, J., Baeza, J., and Denu, J.M. (2016). Investigating Histone Acetylation Stoichiometry and Turnover Rate. *Methods Enzymol.*
- Fernandez-Marcos, P.J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. In *American Journal of Clinical Nutrition*, p.
- Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* *116*, 615–622.
- Fischer, E., and Krebs, G. (1955a). Conversion of phosphorylase beta to phosphorylase alpha in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* *216*, 121–132.
- Fischer, E.H., and Krebs, E.G. (1955b). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.* *216*, 121–132.
- Franckhauser, S., Muñoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B., and Bosch, F. (2002). Increased fatty acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* *51*, 624–630.
- Frazier, H.N., and Roth, M.B. (2009). Adaptive Sugar Provisioning Controls Survival of *C. elegans* Embryos in Adverse Environments. *Curr. Biol.* *19*, 859–863.
- Fuhrer, T., Fischer, E., and Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* *187*, 1581–1590.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V., Weiler, J., O'Brien, P., and MacLennan, D. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* (80-.). *253*, 448–451.
- Gandolfi, G., Cinar, M.U., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Tesfaye, D., Looft, C., Jüngst, H., Tholen, E., Phatsara, C., Schellander, K., et al. (2011). Association of PPARGC1A and CAPNS1 gene polymorphisms and expression with meat quality traits in pigs. *Meat Sci.* *54*, 478–485.
- Garg, S.K., Maurer, H., Reed, K., and Selagamsetty, R. (2014). Diabetes and cancer: Two diseases with obesity as a common risk factor. *Diabetes, Obes. Metab.* *16*, 97–110.
- Gelfand, A., and Smith, A.F.M. (1990). Sampling-Based Approaches to Calculating Marginal Densities. *J. Am. Stat. Assoc.* *85*, 398–409.
- Glorian, M., Duplus, E., Beale, E.G., Scott, D.K., Granner, D.K., and Forest, C. (2001). A single element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene mediates thiazolidinedione action specifically in adipocytes. *Biochimie* *83*, 933–943.
- Gómez-Valadés, A.G., Méndez-Lucas, A., Vidal-Alabró, A., Blasco, F.X., Chillón, M., Bartrons, R., Bermúdez, J., and Perales, J.C. (2008). Pck1 gene silencing in the liver improves glycemia control, insulin sensitivity, and dyslipidemia in db/db mice. *Diabetes* *57*, 2199–2210.
- Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K., and Beale, E. (1983). Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature* *305*, 549–551.
- Greenfield, N.J. (1999). Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* *18*, 236–244.
- Grimsrud, P.A., Carson, J.J., Hebert, A.S., Hubler, S.L., Niemi, N.M., Bailey, D.J., Jochem,

- A., Stapleton, D.S., Keller, M.P., Westphall, M.S., et al. (2012). A quantitative map of the liver mitochondrial phosphoproteome reveals posttranslational control of ketogenesis. *Cell Metab.* *16*, 672–683.
- Groenen, M.A.M., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., Rothschild, M.F., Rogel-Gaillard, C., Park, C., Milan, D., Megens, H.-J., et al. (2012). Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* *491*, 393–398.
- Grönroos, E., Hellman, U., Heldin, C.H., and Ericsson, J. (2002). Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol. Cell* *10*, 483–493.
- Guarente, L. (2011). The logic linking protein acetylation and metabolism. *Cell Metab.* *14*, 151–153.
- Hajarnis, S., Schroeder, J.M., and Curthoys, N.P. (2005). 3'-untranslated region of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA contains multiple instability elements that bind AUF1. *J. Biol. Chem.* *280*, 28272–28280.
- Hakimi, P., Yang, J., Casadesus, G., Massillon, D., Tolentino-Silva, F., Nye, C.K., Cabrera, M.E., Hagen, D.R., Utter, C.B., Baghdy, Y., et al. (2007). Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J. Biol. Chem.* *282*, 32844–32855.
- Hall, J.A., Dominy, J.E., Lee, Y., and Puigserver, P. (2013). The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J. Clin. Invest.* *123*, 973–979.
- Hanson, R.W., and Patel, Y.M. (1994). Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP): The Gene and the Enzyme. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* *69*, 203–281.
- Hanson, R.W., and Reshef, L. (1997). Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Expression. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 581–611.
- Haring, F. (1961). Chapter 2. In *Handbuch Der Tierzucht* Band 3, J. Hammond, I. Johansson, and F. Haring, eds. (Verlag Paul Parey), pp. 46–100.
- Hayes, B., and Goddard, M.E. (2003). Evaluation of marker assisted selection in pig enterprises. *Livest. Prod. Sci.* *81*, 197–211.
- Hebda, C.A., and Nowak, T. (1982). The Purification, Characterization, and Activation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from Chicken Liver Mitochondria. *J. Biol. Chem.* *5503–5514*.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* *324*, 1029–1033.
- Hidalgo, A.M., Bastiaansen, J.W.M., Lopes, M.S., Harlizius, B., Groenen, M.A.M., and de Koning, D.-J. (2015). Accuracy of Predicted Genomic Breeding Values in Purebred and Crossbred Pigs. *G3 Genes|Genomes|Genetics* *5*, 1575–1583.
- Higashida, K., Kim, S.H., Jung, S.R., Asaka, M., Holloszy, J.O., and Han, D.H. (2013). Effects of Resveratrol and SIRT1 on PGC-1 α Activity and Mitochondrial Biogenesis: A Reevaluation. *PLoS Biol* *11*, e1001603.
- Hod, Y., and Hanson, R.W. (1988). Cyclic AMP stabilizes the mRNA for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) against degradation. *J. Biol. Chem.* *263*, 7747–7752.
- Holyoak, T., Sullivan, S.M., and Nowak, T. (2006). Structural insights into the mechanism

- of PEPCK catalysis. *Biochemistry* *45*, 8254–8263.
- Hopgood, M.F., Ballard, F.J., Reshef, L., and Hanson, R.W. (1973). Synthesis and Degradation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Rat Liver and Adipose Tissue. *134*, 445–453.
- Horike, N., Sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Kamata, H., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Kurihara, Y., Kurihara, H., et al. (2008). AMP-activated protein kinase activation increases phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β and thereby reduces cAMP-responsive element transcriptional activity and phosphoenolpyruvate carboxykinase C gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* *283*, 33902–33910.
- Housley, M.P., Udeshi, N.D., Rodgers, J.T., Shabanowitz, J., Puigserver, P., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2009). A PGC-1 α -O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *J. Biol. Chem.* *284*, 5148–5157.
- Humphrey, S.J., James, D.E., and Mann, M. (2015). Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 676–687.
- Hunter, T. (2007). The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Mol. Cell* *28*, 730–738.
- Jäger, S.S., Handschin, C.C., St-Pierre, J.J., and Spiegelman, B.M.B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Pnas* *104*, 12017–12022.
- Jensen, M.D., Chandramouli, V., Schumann, W.C., Ekberg, K., Previs, S.F., Gupta, S., and Landau, B.R. (2001). Sources of blood glycerol during fasting. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *281*, E998-1004.
- Jeon, J.T., Carlborg, O., Törnsten, a, Giuffra, E., Amarger, V., Chardon, P., Andersson-Eklund, L., Andersson, K., Hansson, I., Lundström, K., et al. (1999). A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the IGF2 locus. *Nat. Genet.* *21*, 157–158.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.L., and Zhao, S. (2011). Acetylation Regulates Gluconeogenesis by Promoting PEPCK1 Degradation via Recruiting the UBR5 Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* *43*, 33–44.
- Johnson, T.A., and Holyoak, T. (2010). Increasing the conformational entropy of the Ω -loop lid domain in phosphoenolpyruvate carboxykinase impairs catalysis and decreases catalytic fidelity. *Biochemistry* *49*, 5176–5187.
- Johnson, T.A., and Holyoak, T. (2012). The Ω -loop lid domain of phosphoenolpyruvate carboxykinase is essential for catalytic function. *Biochemistry* *51*, 9547–9559.
- Johnson, T.A., McLeod, M.J., and Holyoak, T. (2016). Utilization of Substrate Intrinsic Binding Energy for Conformational Change and Catalytic Function in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase. *Biochemistry* *55*, 575–587.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* *13*, 2570–2580.
- Kalhan, S.C., Mahajan, S., Burkett, E., Reshef, L., and Hanson, R.W. (2001).

- Glyceroneogenesis and the Source of Glycerol for Hepatic Triacylglycerol Synthesis in Humans. *J. Biol. Chem.* *276*, 12928–12931.
- Kalhan, S.C., Bugianesi, E., McCullough, A.J., Hanson, R.W., and Kelley, D.E. (2008). Estimates of hepatic glyceroneogenesis in type 2 diabetes mellitus in humans. *Metabolism.* *57*, 305–312.
- Kidder, G.W., Pertersen, C.W., and Preston, R.L. (2006). Energetics of Osmoregulation: I. Oxygen consumption by *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* *305*, 309–317.
- Kim, E.Y., Kim, W.K., Kang, H.J., Kim, J.-H., Chung, S.J., Seo, Y.S., Park, S.G., Lee, S.C., and Bae, K.-H. (2012). Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation via activating its enzymatic activity.
- Kim, K.S., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., and Rothschild, M.F. (2000). A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mamm. Genome* *11*, 131–135.
- Kiyohara, K., Gubbins, K.E., and Panagiotopoulos, A.Z. (1998). Phase coexistence properties of polarizable water models. *Mol. Phys.* *94*, 803–808.
- Knyphausen, P., De Boor, S., Kuhlmann, N., Scislowski, L., Extra, A., Baldus, L., Schacherl, M., Baumann, U., Neundorff, I., and Lammers, M. (2016). Insights into lysine deacetylation of natively folded substrate proteins by sirtuins. *J. Biol. Chem.* *291*, 14677–14694.
- Kroymann, J., and Mitchell-Olds, T. (2005). Epistasis and balanced polymorphism influencing complex trait variation. *Nature* *435*, 95–98.
- Kumar, V., and Karon, B.S. (2008). Comparison of measured and calculated bicarbonate values. *Clin. Chem.* *54*, 1586–1587.
- Kunej, T., Wu, X.L., Berlic, T.M., Michal, J.J., Jiang, Z., and Dovc, P. (2005). Frequency distribution of a Cys430Ser polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 (PPARGC1) gene sequence in Chinese and Western pig breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* *122*, 7–11.
- Van Laere, A.-S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A.L., Haley, C.S., Buys, N., Tally, M., et al. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* *425*, 832–836.
- Lawrence, T.L.J., and Fowler, V.R. (2002). Tissues: Growth and Structure Relative to Product Value for Human Consumption. In *Growth of Farm Animals Second Edition*, (CAB International Publishing), pp. 86–101.
- Lawrie, R.A., and Ledward, D.A. (2006a). The structure and growth of muscle. In *Meat Science 7th Edition*, (Woodhead Publishing Ltd.), pp. 41–73.
- Lawrie, R.A., and Ledward, D.A. (2006b). Chemical and biochemical constitution of muscle. In *Meat Science 7th Edition*, (Woodhead Publishing Ltd.), pp. 75–126.
- Lawrie, R.A., and Ledward, D.A. (2006c). The eating quality of meat. In *Meat Science 7th Edition*, (Woodhead Publishing Ltd.), pp. 279–341.
- Lawrie, R.A., and Ledward, D.A. (2006d). The conversion of muscle to meat. In *Meat Science 7th Edition*, (Woodhead Publishing Ltd.), pp. 128–156.
- Leahy, P., Crawford, D.R., Grossman, G., Gronostajski, R.M., and Hanson, R.W. (1999). CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors

- including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription. *J. Biol. Chem.* *274*, 8813–8822.
- Lefaucheur, L., and Vigneron, P. (1986). Post-natal changes in some histochemical and enzymatic characteristics of three pig muscles. *Meat Sci.* *16*, 199–216.
- Legarra, A., Varona, L., and López de Maturana, E. (2011). TM: Threshold Model.
- Lewis, C.T., Seyer, J.M., and Carlson, G.M. (1989). Cysteine 288: An essential hyperreactive thiol of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* *264*, 27–33.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.* *277*, 50607–50611.
- Li, X., Monks, B., Ge, Q., and Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature* *447*, 1012–1016.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* *418*, 797–801.
- Lin, K., Rath, V.L., Dai, S.C., Fletterick, R.J., and Hwang, P.K. (1996). A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in GP. *Science* *273*, 1539–1542.
- Lin, Y. yi, Lu, J. ying, Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., et al. (2009). Protein Acetylation Microarray Reveals that NuA4 Controls Key Metabolic Target Regulating Gluconeogenesis. *Cell* *136*, 1073–1084.
- Lipina, C., Huang, X., Finlay, D., McManus, E.J., Alessi, D.R., and Sutherland, C. (2005). Analysis of hepatic gene transcription in mice expressing insulin-insensitive GSK3. *Biochem. J.* *392*, 633–639.
- Listrat, A., Leuret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B., and Bugeon, J. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *Sci. World J.* *2016*.
- Liu, R., Li, J., and Lv, X. (2011). Association of PGC-1 α Gene with Intramuscular Fat Content and Muscle Fiber Traits and Gene Expression in Tibetan Pigs. *J. Anim. Vet. Adv.* *10*, 2301–2304.
- Liu, X., Chhipa, R.R., Nakano, I., and Dasgupta, B. (2014). The AMPK Inhibitor Compound C Is a Potent AMPK-Independent Antiglioma Agent. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 596–605.
- Liu, X., Du, Y., Trakooljul, N., Brand, B., Muráni, E., Krschek, C., Wicke, M., Schwerin, M., Wimmers, K., and Ponsuksili, S. (2015). Muscle transcriptional profile based on muscle Fiber, mitochondrial respiratory activity, and metabolic enzymes. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 1348–1362.
- Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C., et al. (2012). Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Rep.* *2*, 419–431.
- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., et al. (2011). Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through

- Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth. *Mol. Cell* 42, 719–730.
- Mackay, T.F.C. (2013). Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nat. Rev. Genet.* 15, 22–33.
- MacLennan, D.H., Duff, C., Zorzato, F., Fujii, J., Phillips, M., Korneluk, R.G., Frodis, W., Britt, B. a, and Worton, R.G. (1990). Ryanodine receptor gene is a candidate for predisposition to malignant hyperthermia. *Nature* 343, 559–561.
- Maier, J.A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K.E., and Simmerling, C. (2015). ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* 11, 3696–3713.
- MAPAMA (2016a). Información del sector porcino.
- MAPAMA (2016b). Indicadores económicos de carne de cerdo.
- MAPAMA (2016c). Informe del consumo de alimentación en España.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., and Wilkinson, R.G. (2010a). Feeding standards for maintenance and growth. In *Animal Nutrition Seventh Edition*2, (Pearson), pp. 343–383.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A., and Wilkinson, R.G. (2010b). Fat synthesis. In *Animal Nutrition Seventh Edition*, (Pearson), pp. 219–225.
- Méndez-Lucas, A., Duarte, J.A.G., Sunny, N.E., Satapati, S., He, T., Fu, X., Bermúdez, J., Burgess, S.C., and Perales, J.C. (2013). PEPCK-M expression in mouse liver potentiates, not replaces, PEPCK-C mediated gluconeogenesis. *J. Hepatol.* 59, 105–113.
- Meunier, B., Picard, B., Astruc, T., and Labas, R. (2010). Development of image analysis tool for the classification of muscle fibre type using immunohistochemical staining. *Histochem. Cell Biol.* 134, 307–317.
- Millward, C. a, Desantis, D., Hsieh, C.-W., Heaney, J.D., Pisano, S., Olswang, Y., Reshef, L., Beidelschies, M., Puchowicz, M., and Croniger, C.M. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (Pck1) helps regulate the triglyceride/fatty acid cycle and development of insulin resistance in mice. *J. Lipid Res.* 51, 1452–1463.
- Min, S.W., Cho, S.H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W.W., Huang, E.J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., et al. (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67, 953–966.
- Modjtahedi, N., Hangen, E., Gonin, P., and Kroemer, G. (2015). Metabolic epistasis among apoptosis-inducing factor and the mitochondrial import factor CHCHD4. *Cell Cycle* 14, 2743–2747.
- Montal, E.D., Dewi, R., Bhalla, K., Ou, L., Hwang, B.J., Ropell, A.E., Gordon, C., Liu, W.J., DeBerardinis, R.J., Sudderth, J., et al. (2015). PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Mol. Cell* 60, 571–583.
- Moscardó, A., Vallés, J., Latorre, A., Jover, R., and Santos, M.T. (2015). The histone deacetylase sirtuin 2 is a new player in the regulation of platelet function. *J. Thromb. Haemost.* 13, 1335–1344.

- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., and Rodwell, V.W. (2003). Carbohydrates of Physiologic Significance. In Harper's Illustrated Biochemistry, (McGraw-Hill Companies), pp. 102–110.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005a). Part II: Bioenergetics and metabolism. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 481–920.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005b). Carbohydrates and glycobiology. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 238–271.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005c). Glycolysis, gluconeogenesis and the pentose phosphate pathway. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 521–559.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005d). Citric Acid Cycle. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 601–630.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005e). Fatty Acid Catabolism. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 631–655.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2005f). Lipid Biosynthesis. In Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition, (W.H. Freeman), pp. 787–832.
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppieters, W., Detilleux, J., Hanset, R., Karim, L., Kvasz, A., Leroy, P., and Georges, M. (1999). An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nat. Genet.* *21*, 155–156.
- Nguyen, L.K., Kolch, W., and Kholodenko, B.N. (2013). When ubiquitination meets phosphorylation: a systems biology perspective of EGFR/MAPK signalling. *Cell Commun. Signal.* *11*, 52.
- Nye, C.K., Hanson, R.W., and Kalhan, S.C. (2008). Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J. Biol. Chem.* *283*, 27565–27574.
- Oliveira, A.P., Ludwig, C., Picotti, P., Kogadeeva, M., Aebersold, R., and Sauer, U. (2012). Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol. Syst. Biol.* *8*.
- Olswang, Y., Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C.M., Hakimi, P., Tilghman, S.M., Hanson, R.W., and Reshef, L. (2002). A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 625–630.
- Olswang, Y., Blum, B., Cassuto, H., Cohen, H., Biberman, Y., Hanson, R.W., and Reshef, L. (2003). Glucocorticoids repress transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene in adipocytes by inhibiting its C/EBP-mediated activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 12929–12936.
- Owen, O.E., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* *277*, 30409–30412.
- Papamokos, G. V., Tziatzos, G., Papageorgiou, D.G., Georgatos, S.D., Politou, A.S., and Kaxiras, E. (2012). Structural role of RKS motifs in chromatin interactions: A molecular dynamics study of HP1 bound to a variably modified histone tail. *Biophys. J.* *102*, 1926–1933.

- Park, T., and Casella, G. (2008). The Bayesian Lasso. *J. Am. Stat. Assoc.* *103*, 681–686.
- Park, J.O., Rubin, S.A., Xu, Y.-F., Amador-Noguez, D., Fan, J., Shlomi, T., and Rabinowitz, J.D. (2016). Metabolite concentrations, fluxes and free energies imply efficient enzyme usage. *Nat. Chem. Biol.* *12*, 482–489.
- Parker, B.L., Yang, G., Humphrey, S.J., Chaudhuri, R., Ma, X., Peterman, S., and James, D.E. (2015). Targeted phosphoproteomics of insulin signaling using data-independent acquisition mass spectrometry. *Sci. Signal.* *8*, rs6-rs6.
- Patel, M.S., Owen, O.E., Goldman, L.I., and Hanson, R.W. (1975). Fatty acid synthesis by human adipose tissue. *Metabolism.* *24*, 161–173.
- Philippidis, H., Hanson, R.W., Reshef, L., Hopgood, M.F., and Ballard, F.J. (1972). The Initial Synthesis of Proteins during Development. Phosphoenolpyruvate carboxylase in rat liver at birth. 1127–1134.
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* *429*, 771–776.
- Plomin, R., Haworth, C.M. a, and Davis, O.S.P. (2009). *Quantitative Traits.*
- Price, N.L., Gomes, A.P., Ling, A.J.Y., Duarte, F. V., Martin-Montalvo, A., North, B.J., Agarwal, B., Ye, L., Ramadori, G., Teodoro, J.S., et al. (2012). SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* *15*, 675–690.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.
- Purushotham, A., Schug, T.T., Xu, Q., Surapureddi, S., Guo, X., and Li, X. (2009). Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* *9*, 327–338.
- Reina, R., López-Buesa, P., Sánchez del Pulgar, J., Ventanas, J., and García, C. (2012). Effect of IGF-II (insulin-like growth factor-II) genotype on the quality of dry-cured hams and shoulders. *Meat Sci.* *92*, 562–568.
- Ren, Z., Wang, Y., Ren, Y., Zhang, Z., Gu, W., Wu, Z., Chen, L., Mou, L., Li, R., Yang, H., et al. (2017). Enhancement of porcine intramuscular fat content by overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase in skeletal muscle. *Sci. Rep.* *7*.
- Robles, M.S., Humphrey, S.J., and Mann, M. (2017). Phosphorylation Is a Central Mechanism for Circadian Control of Metabolism and Physiology. *Cell Metab.* *25*, 118–127.
- Rodgers, J.T., and Puigserver, P. (2007). Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12861–12866.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1a and SIRT1. *Nature* *434*, 113–118.
- Ruan, H. Bin, Han, X., Li, M.D., Singh, J.P., Qian, K., Azarhoush, S., Zhao, L., Bennett, A.M.,

- Samuel, V.T., Wu, J., et al. (2012). O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1 α stability. *Cell Metab.* *16*, 226–237.
- Ruan, H. Bin, Singh, J.P., Li, M.D., Wu, J., and Yang, X. (2013). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 301–309.
- Samuel, V.T., Beddow, S. a, Iwasaki, T., Zhang, X.-M., Chu, X., Still, C.D., Gerhard, G.S., and Shulman, G.I. (2009). Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 12121–12126.
- Sano, M., Tokudome, S., Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ogawa, C., Shirakawa, K., Endo, J., Katayama, T., Yuasa, S., Ieda, M., et al. (2007). Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α . *J. Biol. Chem.* *282*, 25970–25980.
- Satapati, S., Sunny, N.E., Kucejova, B., Fu, X., He, T.T., Méndez-Lucas, A., Shelton, J.M., Perales, J.C., Browning, J.D., and Burgess, S.C. (2012). Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J. Lipid Res.* *53*, 1080–1092.
- Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.
- Schwab, A.J., Goresky, C.A., and Rose, C.P. (1989). Handling of Tracer Bicarbonate by the Liver. *Circ. Res.* *65*, 1646–1657.
- Sebti, S., Prebois, C., Perez-Gracia, E., Bauvy, C., Desmots, F., Piro, N., Gongora, C., Bach, A.-S., Hubberstey, A. V., Palissot, V., et al. (2014). BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 4115–4120.
- Selleck, W., and Tan, S. (2008). Recombinant protein complex expression in *E. coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci. Chapter 5*, Unit 5.21.
- Sellier, P. (1998). Chapter 15. In *The Genetics of the Pig*, M.F. Rothschild, and A. Ruvinsky, eds. (CAB International Publishing), pp. 463–510.
- Semakova, J., Hyroššová, P., Méndez-Lucas, A., Cutz, E., Bermudez, J., Burgess, S., Alcántara, S., and Perales, J.C. (2017). PEPCK-C reexpression in the liver counters neonatal hypoglycemia in *Pck1del/delmice*, unmasking role in non-gluconeogenic tissues. *J. Physiol. Biochem.* *73*, 89–98.
- Serra, X., Gil, F., Pérez-Enciso, M., Oliver, M., Vázquez, J., Gispert, M., Díaz, I., Moreno, F., Latorre, R., and Noguera, J.. (1998). A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyrbas line) and Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.* *56*, 215–223.
- Shao, J., Qiao, L., Janssen, R.C., Pagliassotti, M., and Friedman, J.E. (2005). Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. *Diabetes* *54*, 976–984.
- Sharabi, K., Lin, H., Tavares, C.D.J., Dominy, J.E., Camporez, J.P., Perry, R.J., Schilling, R., Rines, A.K., Lee, J., Hickey, M., et al. (2017). Selective Chemical Inhibition of PGC-

- 1 α Gluconeogenic Activity Ameliorates Type 2 Diabetes. *Cell* 169, 148–160.e15.
- She, P., Shiota, M., Shelton, K.D., Chalkley, R., Postic, C., and Magnuson, M.A. (2000). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6508–6517.
- She, P., Burgess, S.C., Shiota, M., Flakoll, P., Donahue, E.P., Malloy, C.R., Sherry, A.D., and Magnuson, M.A. (2003). Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* 52, 1649–1654.
- Shen, Z., Wang, B., Luo, J., Jiang, K., Zhang, H., Mustonen, H., Puolakkainen, P., Zhu, J., Ye, Y., and Wang, S. (2016). Global-scale profiling of differentially expressed lysine acetylated proteins in colorectal cancer tumors and paired liver metastases. *J. Proteomics* 142, 24–32.
- Shi, D., Pop, M.S., Kulikov, R., Love, I.M., Kung, A.L., Kung, A., and Grossman, S.R. (2009). CBP and p300 are cytoplasmic E4 polyubiquitin ligases for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16275–16280.
- Si, X., Chen, W., Guo, X., Chen, L., Wang, G., Xu, Y., and Kang, J. (2013). Activation of GSK3 β by Sirt2 Is Required for Early Lineage Commitment of Mouse Embryonic Stem Cell. *PLoS One* 8.
- Slawson, C., Copeland, R.J., and Hart, G.W. (2010). O-GlcNAc signaling: A metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem. Sci.* 35, 547–555.
- Smemo, S., Tena, J.J., Kim, K.-H., Gamazon, E.R., Sakabe, N.J., Gómez-Marín, C., Aneas, I., Credidio, F.L., Sobreira, D.R., Wasserman, N.F., et al. (2014). Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507, 371–375.
- St.Clair, D.A. (2010). Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 247–268.
- Stark, R., Pasquel, F., Turcu, A., Pongratz, R.L., Roden, M., Cline, G.W., Shulman, G.I., and Kibbey, R.G. (2009). Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 284, 26578–26590.
- Stark, R., Guebre-Egziabher, F., Zhao, X., Feriod, C., Dong, J., Alves, T.C., Ioja, S., Pongratz, R.L., Bhanot, S., Roden, M., et al. (2014). A role for mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) in the regulation of hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 7257–7263.
- Stinshoff, K., Weisshaar, D., Staehler, F., Hesse, D., Gruber, W., and Steier, E. (1977). Relation between concentrations of free glycerol and triglycerides in human sera. *Clin. Chem.* 23, 1029–1032.
- Sullivan, S.M., and Holyoak, T. (2008). Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13829–13834.
- Sunny, N.E., Parks, E.J., Browning, J.D., and Burgess, S.C. (2011). Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 14, 804–810.
- Takikita, S., Schreiner, C., Baum, R., Xie, T., Ralston, E., Plotz, P.H., and Raben, N. (2010). Fiber type conversion by PGC-1 α activates lysosomal and autophagosomal

- biogenesis in both unaffected and pompe skeletal muscle. *PLoS One* 5.
- Tang, X., Wen, S., Zheng, D., Tucker, L., Cao, L., Pantazatos, D., Moss, S.F., and Ramratnam, B. (2013). Acetylation of Drosha on the N-Terminus Inhibits Its Degradation by Ubiquitination. *PLoS One* 8.
- Tilghman, S.M., Hanson, R.W., Reshef, L., Hopgood, M.F., and Ballard, F.J. (1974). Rapid loss of translatable messenger RNA of phosphoenolpyruvate carboxykinase during glucose repression in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 1304–1308.
- Tontonoz, P., Hu, E., Devine, J., Beale, E.G., and Spiegelman, B.M. (1995). PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 15, 351–357.
- Trapani, S., Linss, J., Goldenberg, S., Fischer, H., Craievich, A.F., and Oliva, G. (2001). Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313, 1059–1072.
- Trausch-Azar, J., Leone, T.C., Kelly, D.P., and Schwartz, A.L. (2010). Ubiquitin Proteasome-dependent Degradation of the Transcriptional Coactivator PGC-1 α via the N-terminal Pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 40192–40200.
- Traut, T.W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell. Biochem.* 140, 1–22.
- Treberg, J.R., Lewis, J.M., and Driedzic, W.R. (2002). Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: Key differences between a glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 132, 433–438.
- Tsubota, T., Berndsen, C.E., Erkmann, J.A., Smith, C.L., Yang, L., Freitas, M.A., Denu, J.M., and Kaufman, P.D. (2007). Histone H3-K56 Acetylation Is Catalyzed by Histone Chaperone-Dependent Complexes. *Mol. Cell* 25, 703–712.
- Utter, M.F., and Kurahashi, K. (1954). The present investigation was undertaken in an attempt to elucidate the relationship of the fixation of CO₂ in OAA' by OAA carboxylase to that in malate catalyzed by "malic" enzyme. It was hoped that protein separa-. *J. Biol. Chem.* 207, 787–802.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Eaton, E.N., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001). hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107, 149–159.
- Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., and Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Sci.* 77, 324–330.
- Verdin, E., and Ott, M. (2014). 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 258–264.
- Vollhardt, K.P.C., and Schore, N.E. (2008). Tautomería ceto-enólica. In *Química Orgánica Estructura Y Función*, (Barcelona: Omega), pp. 814–855.
- Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Scholz, C., Kelstrup, C.D., Young, C., Nielsen, M.L., Olsen, J. V., Brakebusch, C., and Choudhary, C. (2012). Proteomic Analyses Reveal Divergent Ubiquitylation Site Patterns in Murine Tissues. *Mol. Cell. Proteomics* 11, 1578–1585.

- Wang, L., Xu, L., Liu, X., Zhang, T., Li, N., Hay, E.H., Zhang, Y., Yan, H., Zhao, K., Liu, G.E., et al. (2015). Copy number variation-based genome wide association study reveals additional variants contributing to meat quality in Swine. *Sci. Rep.* 5.
- Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., et al. (2010). Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327, 1004–1007.
- Wang, W., Xue, W., Jin, B., Zhang, X., Ma, F., and Xu, X. (2013). Candidate gene expression affects intramuscular fat content and fatty acid composition in pigs. *J. Appl. Genet.* 54, 113–118.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Z.* 152, 309–319.
- Watford, M., Hod, Y., Chiao, Y., Utter, F., and Hanson, R.W. (1981). The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. *J Biol Chem* 256, 10023–10027.
- Weinert, B.T., Schölz, C., Wagner, S.A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J.A., and Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Rep.* 4, 842–851.
- Wilson-Grady, J.T., Haas, W., and Gygi, S.P. (2013). Quantitative comparison of the fasted and re-fed mouse liver phosphoproteomes using lower pH reductive dimethylation. *Methods* 61, 277–286.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
- Wondisford, A.R., Xiong, L., Chang, E., Meng, S., Meyers, D.J., Li, M., Cole, P.A., and He, L. (2014). Control of foxo1 gene expression by co-activator p300. *J. Biol. Chem.* 289, 4326–4333.
- Wood, A.R., Esko, T., Yang, J., Vedantam, S., Pers, T.H., Gustafsson, S., Chu, A.Y., Estrada, K., Luan, J., Kutalik, Z., et al. (2014). Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat. Genet.* 46, 1173–1186.
- Xiao, Y., Nagai, Y., Deng, G., Ohtani, T., Zhu, Z., Zhou, Z., Zhang, H., Ji, M., Lough, J., Samanta, A., et al. (2014). Dynamic interactions between TIP60 and p300 regulate FOXP3 function through a structural switch defined by a single lysine on TIP60. *Cell Rep.* 7, 1471–1480.
- Xu, H., Yang, Q., Shen, M., Huang, X., Dembski, M., Gimeno, R., Tartaglia, L.A., Kapeuer, R., and Wu, Z. (2005). Dual specificity MAPK phosphatase 3 activates PEPCK gene transcription and increases gluconeogenesis in rat hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 280, 36013–36018.
- Yang, H., Zhou, L., Shi, Q., Zhao, Y., Lin, H., Zhang, M., Zhao, S., Yang, Y., Ling, Z.-Q., Guan, K.-L., et al. (2015). SIRT3-dependent GOT2 acetylation status affects the malate-aspartate NADH shuttle activity and pancreatic tumor growth. *EMBO J.* e201591041.
- Yang, J., Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2009a). What is the metabolic role of

- phosphoenolpyruvate carboxykinase? *J. Biol. Chem.* **284**, 27025–27029.
- Yang, J., Reshef, L., Cassuto, H., Aleman, G., and Hanson, R.W. (2009b). Aspects of the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **284**, 27031–27035.
- Yang, J., Kong, X., Martins-Santos, M.E.S., Aleman, G., Chaco, E., Liu, G.E., Wu, S.Y., Samols, D., Hakimi, P., Chiang, C.M., et al. (2009c). Activation of SIRT1 by resveratrol represses transcription of the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) by deacetylating hepatic nuclear factor 4 α . *J. Biol. Chem.* **284**, 27042–27053.
- Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O’Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* **20**, 111–112.
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., and Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* **23**, 2369–2380.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 131–138.
- Zelle, R.M., Trueheart, J., Harrison, J.C., Pronk, J.T., and Van Maris, A.J.A. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5383–5389.
- Zhang, Y., Huypens, P., Adamson, A.W., Chang, J.S., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Burk, D., Klein, J., Perwitz, N., et al. (2009). Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* **284**, 32813–32826.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., et al. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* **327**, 1000–1004.
- Zupke, C., Sinskey, A.J., and Stephanopoulos, G. (1995). Intracellular flux analysis applied to the effect of dissolved oxygen on hybridomas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 27–36.